



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Cambios estructurales y funcionales en las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces

Fanello, Diego Darío

Doctor en Ciencias Naturales

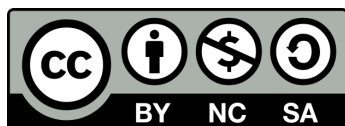
Dirección: Bartoli, Carlos Guillermo

Co-dirección: Guiamet, Juan José

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2016

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20160408001450>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

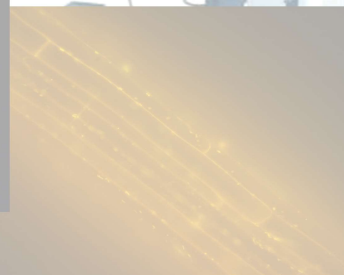
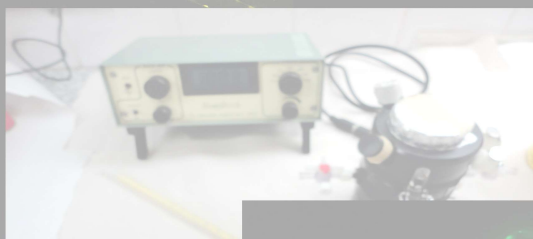
“Cambios estructurales y funcionales en las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces”

Autor: **Lic. Diego Darío Fanello**

Director: Dr. Carlos Guillermo Bartoli

Co-Director: Dr. Juan José Guamet

Tesis Doctoral



El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales,
fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal de La Plata (INFIVE)
CONICET- UNLP, bajo la dirección del Dr. Carlos Guillermo Bártoli y el Dr.
Juan José Guiamét.

...”De ahí, de ahí justamente aprendí a mirar pa bajo.
Me miré los pieses y me dio vergüenza de ensuciar la tierra con las alpargatas.

No sé si me entiende,
pero no me arrime leña, yo tengo las mía.
Me suebra un invierno pa...pa arder todo un año.
Quiero que me entienda por qué abarco ancho.
Porque yo no quiero dejar mis palomas
a merced del viento, sin tener reparo.
Porque tengo raíces que crecen por dentro
lambiendo las toscas pa parir verano” ...

'Herencia pa un hijo gaucho'
(José Larralde)

Dedico este trabajo a todos los contribuyentes del estado argentino que a través de sus impuestos han hecho posible la obtención de recursos para el avance de la ciencia en nuestro país, a mis compañeros de trabajo y a mi familia. Especialmente hago una dedicatoria a mi viejo y a mi hermano y a las mujeres de mi vida, la canela que mi compañera de vida, y a mi vieja que aunque no se encuentra presente de manera física me acompañará siempre.

Indice.....	1
Agradecimientos.....	5
Abreviaturas.....	6
Unidades.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	11
Capítulo I: Introducción General.....	14
1.1 Las Plantas: conceptos generales.....	15
1.2 La Senescencia.....	18
1.2.1 Concepto de senescencia.....	18
1.2.2 Relevancia del proceso de senescencia.....	19
1.2.3 Estudio de la senescencia.....	25
1.3 Las Raíces.....	27
1.3.1 Conceptos generales.....	27
1.3.2 Funciones de las raíces.....	29
1.3.3 Estudio de las raíces.....	30
1.4 Las mitocondrias.....	33
1.4.1 Evolución del concepto de “mitocondria”.....	33
1.4.2 Las mitocondrias vegetales.....	34
1.4.3 Estudio de las mitocondrias.....	36
1.5 Objeto de estudio de la presente tesis.....	39
1.5.1 Vacíos en el conocimiento del proceso de senescencia... 39	
1.5.2 ¿Senescencia en raíces?	40
1.5.3 Objetivos e hipótesis.....	41
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	43

2.1 Material vegetal y Cultivos en hidroponía.....	44
2.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.1.2 Soja (<i>Glycine max</i>)	46
2.2 Consumo de O ₂	49
2.3 SDS-PAGE y Western Blots.....	51
2.4 Metabolismo del Nitrógeno.....	53
2.4.1 Consumo de nitratos.....	53
2.4.2 Actividad Nitrato Reductasa.....	54
2.5 Microscopía confocal y de epifluorescencia.....	57
2.6 Cuantificación de almidón y azúcares solubles.....	60
2.7 Otras mediciones	63
2.7.1 Peso seco.....	63
2.7.2 Área foliar.....	63
2.7.3 Mediciones de SPAD.....	63
2.8 Análisis estadístico.....	64
Capítulo III: Variaciones fenológicas de la actividad radical. Las raíces y la	
senescencia monocárpica.	65
3.1 Introducción.....	66
3.2 Resultados en <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
3.2.1 Estadios del desarrollo reproductivo en <i>Arabidopsis</i>	
<i>thaliana</i>	70
3.2.2 Acumulación de biomasa.....	72
3.2.3 Consumo de O ₂	73
3.2.4 Consumo de NO ₃ ⁻	73
3.2.5 Actividad Nitrato Reductasa.....	73

3.2.6 Proteínas totales de las raíces.....	77
3.2.7 Discusión y conclusiones parciales.....	78
3.3 Resultados en Soja.....	82
3.3.1 Serie fenológica y condiciones de crecimiento.....	82
3.3.2 Cuantificación de clorofila, área foliar y consumo de agua..	85
3.3.3 Partición de la biomasa entre los órganos vegetativos y reproductivo.....	88
3.3.4 Consumo de O ₂	90
3.3.5 Consumo de NO ₃ ⁻	92
3.3.6 Actividad Nitrato Reductasa.....	94
3.3.7 Proteínas totales y mitocondriales.....	96
3.3.8 Discusión.....	98
3.4 Conclusiones finales.....	106
Capítulo VI: Respuestas radicales a la senescencia inducida por Oscuridad	108
4.1 Introducción.....	109
4.2 Diseño experimental.....	113
4.3 Resultados.....	115
4.3.1 Efecto de la oscuridad en la proporción de biomasa aérea y radical.....	115
4.3.2 Actividad respiratoria y cantidad de proteínas totales y mitocondriales.....	118
4.3.3 Cuantificación de las mitocondrias en imágenes de microscopía confocal.....	121
4.3.4 Cuantificación de almidón y azúcares solubles.....	126
4.3.5 Efecto del agregado de glucosa.....	128

4.3.6 Efecto de la oscuridad en mutantes atg5-KO.....	130
4.4 Discusión.....	135
4.4.1 Efecto de la oscuridad en la proporción de biomasa aérea y radical.....	135
4.4.2 Cambios en la cantidad y actividad mitocondrial en raíces de plantas sometidas a oscuridad.....	136
4.4.3 Tamaño de las mitocondrias radicales en oscuridad prolongada.....	138
4.4.4 Caída de la respiración radical y cambios en las concentraciones de azúcares solubles y almidón.....	140
4.4.5 Participación de la autofagia en la degradación de mitocondrias.....	143
4.5 Conclusiones.....	144
Capítulo V: Conclusiones finales.....	145
5.1 Cumplimiento de objetivos y evaluación de la hipótesis general de trabajo.....	146
5.2 Perspectivas futuras.....	152
Bibliografía.....	156

Agradecimientos

A los doctores Juan José Guimet y Carlos Guillermo Bartoli por darme la oportunidad de trabajar en el INFIVE y guiarme en el camino de la ciencia.

Al Dr. Daniel Gonzáles, a la Dra. Geraldine Bonnard y al Dr. Eduardo Zabaleta por haberme cedido los anticuerpos contra proteínas mitocondriales utilizados en esta tesis.

A todos los integrantes del INFIVE

A la Doctora Lorenza Costa por enseñarme diversas técnicas bioquímicas y ser un apoyo constante cuando lo requería y a las Doctoras Corina Graciano y Virginia Luquez por facilitarme de material para trabajar y responder todas mis inquietudes.

A los Doctores Cristian Antonio Carrión y Eduardo Alberto Tambussi por hacerme parte de los “los tres mosquetros”

A la Doctora Maria Gabriela Cano, la Doctora Diana Lauf y Santiago Martines por ayudarme siempre en los trabajos y quedarse horas extra trabajando.

A todos los amigos de la vida, en especial al “Cacho” Miguelissi con quien compartimos más de 10 años de convivencia.

Al Estado Argentino que a través del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y la CIC (Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires) me otorgaron las becas y subsidios a la investigación hicieron posibles este trabajo.

A todos aquellos que por falta de memoria he olvidado.

Abreviaturas y Siglas

atg: Gen involucrado en la autofagia (del ingles: *autophagy*).

AOX: Oxidasa Alternativa (del inglés *Alternative Oxidase*)

ATP: Adenosín trifosfato

C: Carbono.

CAT: Ciclo del ácido tricarboxílico

cit c: Citocromo c

et al: “y otros” (del latín: *et alli*)

GFP: Proteína Verde Fluorescente (del ingles: *Green Fluorescent Protein*).

i.e.: esto es, es decir (del latín *id est*)

KO: mutante por inserción de T-DNA (del ingles: *Knock out*)

MT: Mitotracker

N: Nitrógeno.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

P: Fósforo

P: Probabilidad

PBS: Buffer Fosfato Salino (del ingles: *Phosphate Buffer Saline*).

pf: Peso Fresco

ps: Peso Seco

SAG: Genes asociados a la senescencia (del ingles: *Senescence Associated Genes*).

SDS-PAGE: Electroforesis en gel desnaturizante.

SPAD: colorímetro que permite estimar el contenido de clorofila en las hojas.

UQ: Ubiquinona

v.g.: ejemplo (del latín: *verbi gratia*).

var: Variedad.

YFP: Proteína amarilla fluorescente (del ingles: *Yellow Fluorescent Protein*). 11

Unidades

µg: Microgramos.

µm: Micrómetros.

µM: Micromolar.

g: Gramos.

h: hora

hs: horas.

d: días

M: Molar.

mg: Miligramos.

min: minutos.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

nm: Nanómetros.

p/v: peso/volumen.

ul: Microlitros.

v/v: volumen/volumen.

°C: grados Celsius

g: unidad de centrifugación

ha: hectárea

tn: tonelada

kg: kilogramo

Resumen

En las plantas, el término “senescencia” se utiliza para aludir al deterioro estructural y funcional que sufren muchos órganos en la fase terminal de su desarrollo (Noodén, 1988a). En particular, en las especies anuales todos los órganos vegetativos atraviesan un proceso generalizado de senescencia durante el final del desarrollo reproductivo (“senescencia monocárpica”) (Noodén, 1988a). Se ha estudiado extensamente la senescencia de las hojas y flores, pero se ha desatendido la de otros órganos como las raíces. Como resultado del énfasis puesto en la senescencia foliar, la mayoría de los estudios se han focalizado en el desmantelamiento de los cloroplastos. Son escasos los estudios sobre las modificaciones que ocurren durante el envejecimiento en otras organelas, particularmente las mitocondrias. El objetivo general de la presente tesis fue determinar modificaciones funcionales y estructurales de mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Arabidopsis thaliana* sería un caso intermedio entre una planta monocárpica y una planta de crecimiento continuo, o por lo menos no presentó los síntomas de senescencia de una planta monocárpica típica. Estos resultados condujeron a realizar ensayos también en una especie monocárpica típica, como la soja (*Glycine max*). El patrón de cambio en el metabolismo radical a lo largo del desarrollo reproductivo fue similar en *Arabidopsis thaliana* y en soja. Esto indicaría que la actividad radical no está ligada a un proceso de senescencia como el que sufren los tejidos aéreos, y que es moderadamente distinto en *Arabidopsis* y soja. Las raíces mantuvieron su actividad metabólica y acumularon biomasa

aún durante el período de crecimiento de las semillas. En plantas desfrutadas (plantas de soja a las cuales se les extrajo los frutos) las raíces parecerían ser el destino de fotoasimilados más importante, ya que incrementaron su biomasa 4,7 veces respecto del estadio inicial (es decir, en 54 días). La falta de compensación entre la cantidad de tejido producido y la actividad metabólica en estos tratamientos serían indicadores de desajustes metabólicos, y la AOX (Oxidasa Alternativa) podría cumplir una función de “alivio” de las presumiblemente grandes cantidades de productos reducidos de la fotosíntesis (fotosintatos) presentes en las raíces de las plantas desfrutadas. La disminución de la cantidad de proteína total y mitocondrial hacia las etapas finales del período de crecimiento de las semillas, podría indicar que existen procesos de exportación de N desde las raíces. El decaimiento de la actividad respiratoria de las raíces posterior a la muerte de las hojas, sugeriría que las raíces experimentan un envejecimiento por falta de fotoasimilados. Para estudiar este tema se realizaron ensayos en plantas inducidas a senescer en oscuridad.

En plantas de *Arabidopsis* que fueron sometidas a oscuridad continua aumentó la proporción de biomasa de las rosetas, respecto de las raíces. En las raíces decrecieron la actividad respiratoria, la cantidad de proteína mitocondrial y el número total de mitocondrias. Las mitocondrias de menor tamaño son la que se encontraron en mayor abundancia y las que más cambiaron en su cantidad debido a los tratamientos de oscuridad, por lo que parecería ser las que más contribuyen a la actividad respiratoria radical. En oscuridad disminuyó más marcadamente el número de mitocondrias activas que el de mitocondrias totales, lo que parece indicar que existieron conjuntos

de mitocondrias con actividades basales o en “*standby*”. El contenido de azúcares solubles disminuyó, y esto podría explicar las caídas de las tasas metabólicas por un efecto de hambreado. El aumento de la respiración radical por el agregado temporario de glucosa confirmaría esta hipótesis. El estudio con mutantes KO en la vía autofágica (atg5-KO) de *Arabidopsis thaliana* no arrojó resultados concluyentes respecto de la participación de esta vía en la degradación de las mitocondrias radicales.

De acuerdo a los datos obtenidos se puede concluir que se cumplió con el objetivo planteado en términos generales. También se ha aportado información respecto a temas poco estudiados como la fisiología de las raíces y las mitocondrias en el contexto de la senescencia.

Abstract

In Plants, "Senescence" is used to refer to structural and functional deteriorative changes undergone by many organs during the phase of their development (Noodén, 1988a). In annual species particularly, vegetative organs suffer a generalized senescence process at the end of their reproductive stages of development ("monocarpic senescence") (Noondén, 1988a). Senescence and aging of leaves and fruits was extensively studied, but other organs, such as roots, were disregarded. As result of the emphasis placed on leaf senescence, most of studies focused on chloroplast dismantling. Research about changes in other organelles during aging, in particular mitochondria, are scarce. The aim of this thesis was to determine the functional and structural modifications of mitochondria during root and leaf senescence.

Unlike typical monocarpic species, , in *Arabidopsis thaliana* there is a marked overlap between reproductive and vegetative growth after the onset of flowering. This led me to conduct experiments also with a typical monocarpic plant, such as soybean (*Glycine max*). The pattern of changes in root metabolism during reproductive development was similar in both, *Arabidopsis thaliana* and soybean. This would indicate that root activity is not tightly linked to senescence processes occurring in the above-ground, green tissues. Roots maintained high-moderate metabolic activity and accumulated biomass even during the seed growth period. Roots of soybean plants whose fruits were removed ("depodded") became the strongest sink for photoassimilates, as their biomass increased 4,7-fold in 54 days. Lack of compensation between the amount of biomass produced and metabolic activity in depodded treatments

might suggest metabolic imbalances, and AOX (Alternative Oxidase) seem to play a role as an “overflow” of excess photosynthates in roots. Decreasing amount of both total and mitochondrial protein in the roots at final stages of seed growth, could indicate that N was exported from roots to other parts of the plant. The late decline of roots respiratory activity after leaves death, could suggest the operation of a root aging process due to photoassimilate starvation. Dark-induced senescence studies were performed to explore this issue.

Arabidopsis plants exposed to continuous darkness for several days showed a greater proportion of rosette, compared with roots biomass. Respiratory activity, the amount of mitochondrial protein and the total number of mitochondria decreased in darkness compared to plants under a light/dark regime. Smaller mitochondria were found in greater abundance in all treatment. In darkness, smaller mitochondria changed the most in quantity, which would suggest that smaller mitochondria are the largest contributors to root respiration. In darkness, the number of active mitochondria decreased more than their total number, implying that there was a set of mitochondria with basal activity or in “standby”. The decrease of the soluble sugar content in darkness could be responsible for the reduced metabolic rates. Increased root respiration by the addition of glucose seems to confirm this hypothesis. Results of studies with an *atg5*- KO autophagic pathway mutant of *Arabidopsis thaliana* were inconclusive and did not shed light on the participation of this pathway in root mitochondria degradation.

According to the data obtained it can be concluded that the objectives proposed were met in general. This work has also provided information

regarding little studied topics, such as root and mitochondria physiology in the context of senescence.

Capítulo I

Introducción general

1.1 Las Plantas: conceptos generales

Las plantas son un conjunto de organismos que conforman un linaje dentro del grupo de los eucariotas con características que las diferencian de muchos de los organismos vivos, entre las que se destaca la presencia de cloroplastos. Los cloroplastos son organelas subcelulares que le permiten a las plantas ser organismos autótrofos. El proceso clave para esto es la fotosíntesis, que depende esencialmente de la energía lumínica y el CO₂ atmosférico, y cuyo producto principal son los compuestos carbonados reducidos. Esto ubica a las plantas como sostén energético y nutricional de la mayoría de los organismos heterótrofos y en la base de casi todos los ecosistemas.

Dentro del amplio grupo que comprende a las plantas, los cormófitos u organismos terrestres poseen una serie de características morfofisiológicas que les permiten sobrellevar la vida en un ambiente no acuático. El plan morfológico general de una planta terrestre, en términos generales, comprende principalmente 3 elementos vegetativos: la raíz, el tallo y las hojas, y los órganos reproductivos. Aún con infinitas variantes, generalizando se puede describir la función de cada parte de la planta de la siguiente manera: 1) La raíz confiere anclaje y absorción de agua y minerales, 2) El tallo confiere principalmente sostén y conexión entre raíces y hojas, 3) Las hojas son el principal sitio en donde se produce la fotosíntesis y en donde se genera la fuerza fundamental que impulsa la circulación de agua y nutrientes en la planta entera y 4) Los órganos reproductivos producen estructuras que servirán para la propagación y la descendencia.

Cada parte de una planta está conformada por varios tipos celulares que responden a diferentes funciones (v.g. sostén, protección, conducción, almacenaje, fotosíntesis, etc.). Sin embargo, se puede generalizar un modelo de célula vegetal como se puede ver en la Figura 1.1. Cabe destacar en las células vegetales, respecto de otras células eucariotas, las siguientes peculiaridades:

- 1) La vacuola central: ocupa la mayor parte del volumen celular y es el lugar en donde se almacena principalmente agua e infinidad de metabolitos y en donde se producen numerosas de las reacciones metabólicas.
- 2) La pared celular: principalmente formada de polímeros de azúcares (vg. celulosa, hemicelulosa, etc.) y otros compuestos (v.g. lignina, ceras en células epidérmicas, calosa, etc.). Esta le confiere a las células un soporte estructural y conforma un espacio extracelular denominado apoplasto que es sitio de tránsito y de reacciones metabólicas.
- 3) Los cloroplastos: son el asiento de la fotosíntesis y de numerosas reacciones metabólicas.

Hay que remarcar que el resto de las organelas celulares de las plantas se diferencian en varios aspectos de las del resto de los organismos eucariotas. Debido a que el objeto de estudio de esta tesis está focalizado en gran parte en las mitocondrias, se prestará especial atención a estos orgánulos.

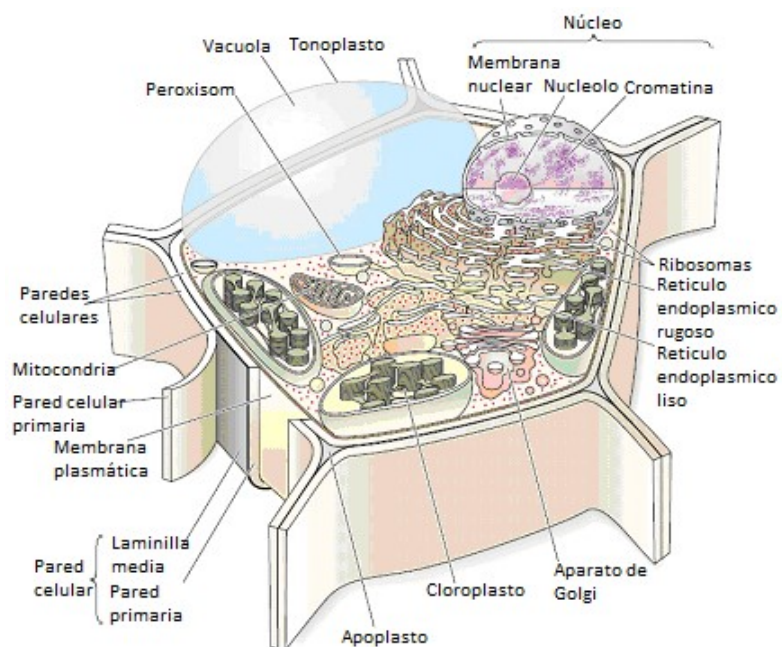


Figura 1.1. Modelo generalizado de una célula vegetal (modificado de Taiz y Zeiger, 2003)

1.2 La senescencia

1.2.1 Concepto de senescencia

En las plantas, el término “senescencia” se utiliza para aludir al deterioro estructural y funcional que sufren muchos órganos en la fase terminal de su desarrollo (Noodén, 1988a). En particular, en las especies anuales todos los órganos vegetativos atraviesan un proceso generalizado de senescencia durante el final del desarrollo reproductivo que se conoce como “senescencia monocárpica” (Noodén, 1988b) (Figura 1.2). La senescencia comprende diversos procesos fisiológicos posteriores a la floración que están involucrados en la remoción y traslado de sustancias y minerales desde las hojas hacia los órganos en crecimiento como frutos y semillas (Noodén, 1988a).

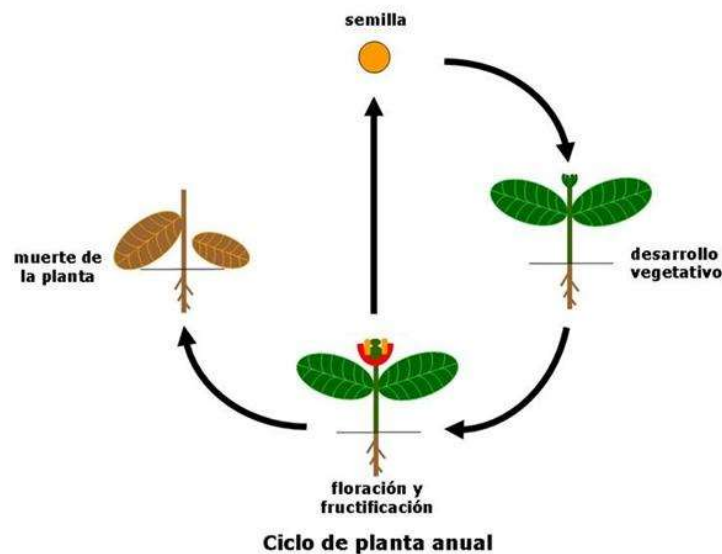


Figura 1.2. Ciclo de vida de una planta anual: “senescencia monocárpica”. (fuente: www.unavarra.es)

El concepto de senescencia puede variar según el objeto de estudio. La senescencia o envejecimiento en animales y plantas son absolutamente independientes y reflejan procesos completamente diferentes (Noodén, 2004). Por otro lado, el estudio de la senescencia monocárpica o la senescencia de órganos como las hojas o pétalos de flores comprende distintas formas de estudio y abordaje de la problemática.

Envejecimiento, senescencia, maduración, son todos términos con significado diferente. La senescencia comprende fenómenos ocurren en el final del periodo de crecimiento y desarrollo e incluyen: 1) preparación de las células de los tejidos, 2) la ejecución del proceso, y 3) preparación para un próximo período de desarrollo y crecimiento (Noodén, 1988a). La senescencia abarca un conjunto de procesos que progresan con la “edad”, pero esto no quiere decir que dependa exclusivamente de la “edad”. (Noodén, 2004). La senescencia no es sencillamente una acumulación pasiva de deterioro (Noodén, 2004) sino que comprende una combinación de procesos de degradación y exportación que pueden o no culminar en el deterioro celular.

1.2.2 Relevancia del proceso de senescencia

Relevancia agronómica

La magnitud de la senescencia se puede evidenciar desde escalas subcelulares hasta escalas ecosistémicas, incluidos los agroecosistemas. Por ejemplo, en la región pampeana argentina puede observarse a través de imágenes satelitales del NVDI (“Normalized Difference Vegetation Index”) la

evolución de la senescencia en los cultivos (principalmente soja) entre los períodos de máxima producción de biomasa y postmadurez (Figura 1.3).

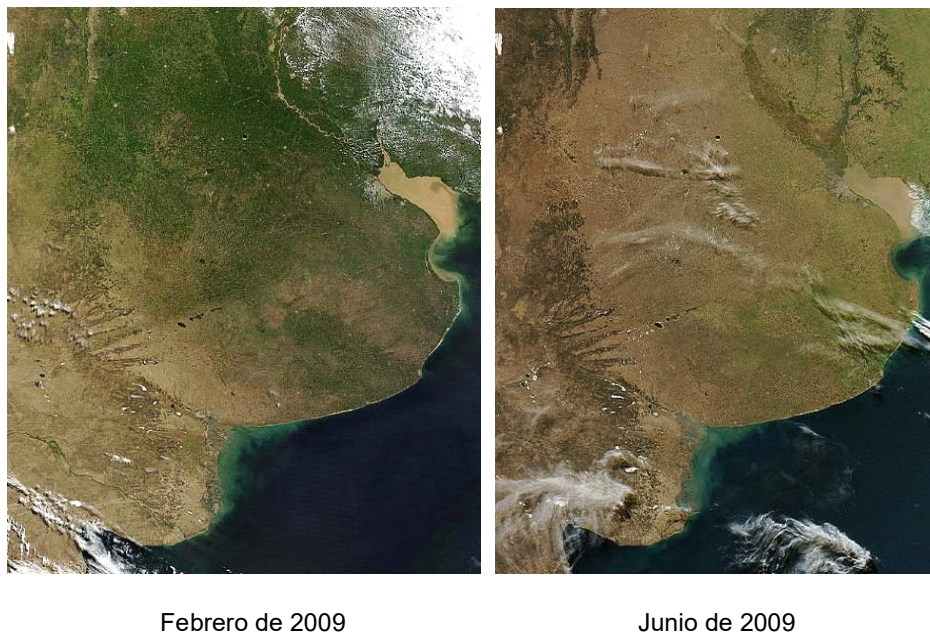


Figura 1.3. Fotos satelitales de la provincia de Buenos Aires en donde se puede apreciar visiblemente la diferencia de la superficie verde debida a la senescencia del cultivos de soja principalmente, entre los meses de Febrero y Junio de 2009 (fuente: www.meteo-practica.blogspot.com.ar)

Argentina es uno de los principales países productores de granos del mundo, en donde las producciones más importantes son los cultivos de soja, maíz y trigo. La producción en nuestro país se ha visto incrementada en los últimos años especialmente debido a la expansión de la frontera agraria del cultivo de soja (Figura 1.4a), sin embargo los rendimientos no han acompañado este incremento (Figura 1.4b). Mientras que el área sembrada creció casi de manera exponencial, los rendimientos por hectárea han crecido a tasas mucho menores y en los últimos 20 años parecen haberse estancado. La manera más adecuada para poder aumentar los niveles de producción preservando la calidad de los ambientes de manera de satisfacer la creciente demanda global de alimentos, fibras, biocombustibles y biomateriales deberá ser acrecentando

los rendimientos (Barberis y Bongiovanni, 2015). Esto enfatiza la necesidad de profundizar la información que pueda ser de utilidad para la selección de genotipos superiores en los programas de mejoramiento, y en este sentido, el estudio de la senescencia aporta información sustancial.

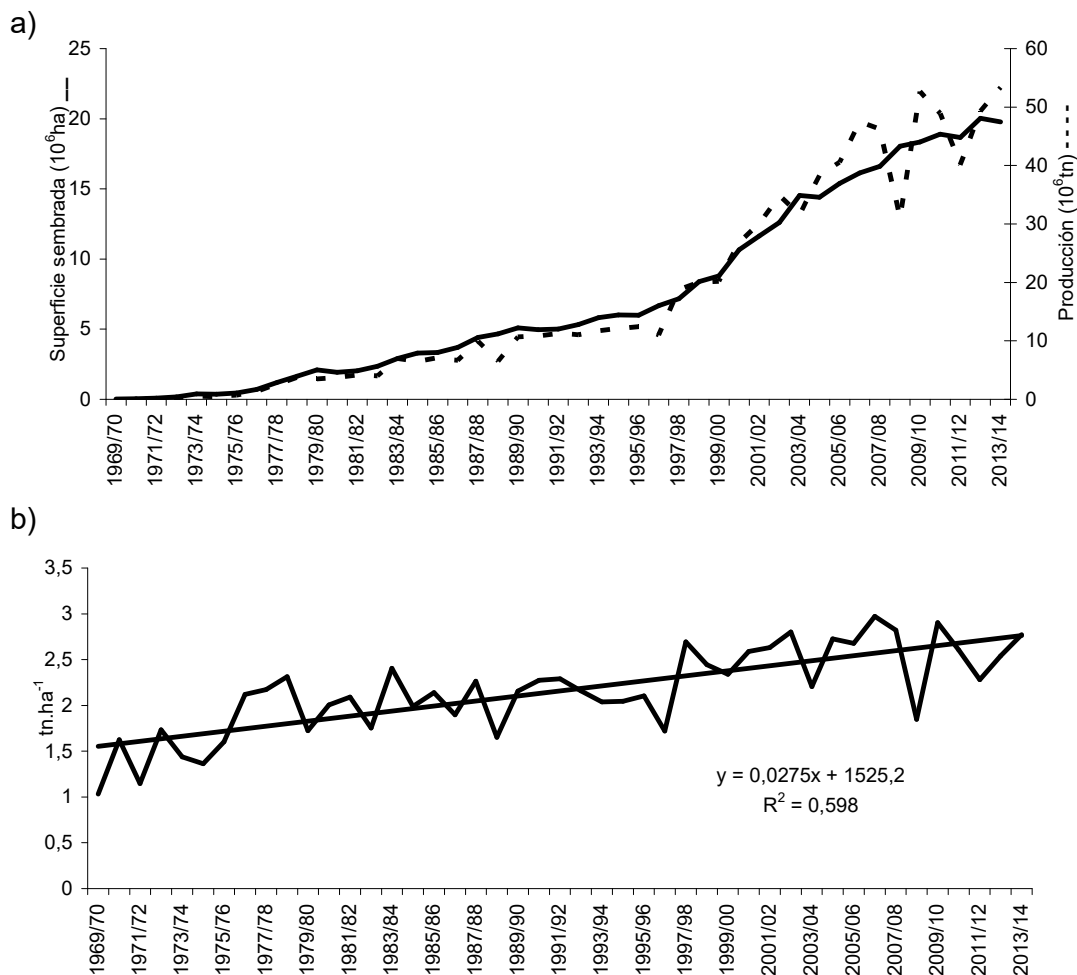


Figura 1.4. Evolución del cultivo de Soja en Argentina. a) Evolución del área sembrada y producción; b) Evolución del rendimiento. Fuente: SIIA (www.siaa.gov.ar).

Una de las estrategias para obtener mejores resultados en la producción agraria puede ser la utilización de variedades que retrasen la senescencia. Un ejemplo de esto son las variedades “stay green” (es decir, que retienen área foliar verde), donde la senescencia demorada de los órganos fotosintéticos

prolonga el periodo de llenado de granos y por lo tanto la producción (Thomas et al. 2014). Otro de los campos del conocimiento agronómico en donde la senescencia tiene relevancia es la fisiología post cosecha, que comprende la evolución de los productos (v.g.: tubérculos, bulbos, raíces, hojas, flores, tallos y hortalizas) desde que son cosechados y almacenados hasta que son comercializados. El patrón de senescencia natural de las plantas no siempre puede ser aplicable a productos cosechados, sin embargo pueden existir similitudes (Pogson y Morris, 2004). La vida de almacenamiento y la calidad comercial de los productos cosechados dependen de la velocidad y el modo en que se lleven a cabo los procesos de senescencia. Por ejemplo, en los vegetales de hoja la senescencia es indicada por la pérdida de clorofila y marchitamiento (Pogson y Morris, 2004). El grado de madurez en el que se cosechan los productos y el método de cosecha son significativos en los procesos postcosecha. Por ejemplo, el brócoli puede incluir hojas, tallos y flores, y esto puede permitir la redistribución de metabolitos hacia tejidos con alta actividad metabólica, y muchos tubérculos y bulbos son capaces de ser "autosuficientes funcionalmente" cuando son separados de la planta (Pogson y Morris, 2004).

La senescencia foliar juega un rol significativo en la determinación de la composición de muchos productos agrícolas. La acumulación o la disminución de las cantidades de proteínas o carbohidratos en las partes comestibles como hojas, semillas y raíces, o en cultivos de importancia económica como el tabaco o el algodón, son afectados por cambios dependientes de la edad en los patrones metabólicos y los *pools* de metabolitos en las hojas (People y Dalling, 1988). Por otro lado, el contenido de

nitrógeno en los granos (utilizado como parámetro de calidad) está determinado en gran medida por la retranslocación de aminoácidos provenientes de proteínas de distintos órganos de la planta (v.g. hojas, tallo, raíz) (Noodén, 1988a). Con esto queda de manifiesto que la senescencia es un proceso de gran impacto en la producción de alimentos y su comprensión en profundidad podría aportar herramientas para aumentar los rendimientos de los cultivos.

Relevancia biológica

Como se muestra en la Figura 1.5 el carbono (C) y el nitrógeno (N) necesarios para el crecimiento pueden derivar de varias fuentes, que pueden ser externas o internas. El N externo puede provenir de la mineralización de la materia orgánica del suelo, la fijación microbiana de N atmosférico, N orgánico incorporado desde micorrizas, y en algunos ecosistemas, de la mineralización no biológica de N atmosférico. El C proviene principalmente de asimilación de CO₂ en la atmósfera mediante la fotosíntesis. Los recursos internos son almacenados o redistribuidos a través de los procesos fisiológicos de removilización y reciclaje (Millard y Grelet, 2010).

Por ejemplo, en las especies perennes de climas estacionales los principales órganos fotosintéticos, las hojas, sufren una abscisión completa (separación de la planta) generalmente en otoño-invierno (Figura 1.6). Previo a la abscisión, la senescencia es de crucial importancia ya que implica la degradación de componentes celulares, principalmente proteínas y clorofila, cuyos productos de degradación (v.g. aminoácidos en el caso de las proteínas)

se redistribuirán y almacenarán para el próximo ciclo que comenzará en la primavera (Millard y Grelet, 2010). Este mecanismo es de vital importancia ya que el rebrote, ya sea de flores o de hojas, estará condicionado en parte por la acumulación de productos de degradación de la senescencia.

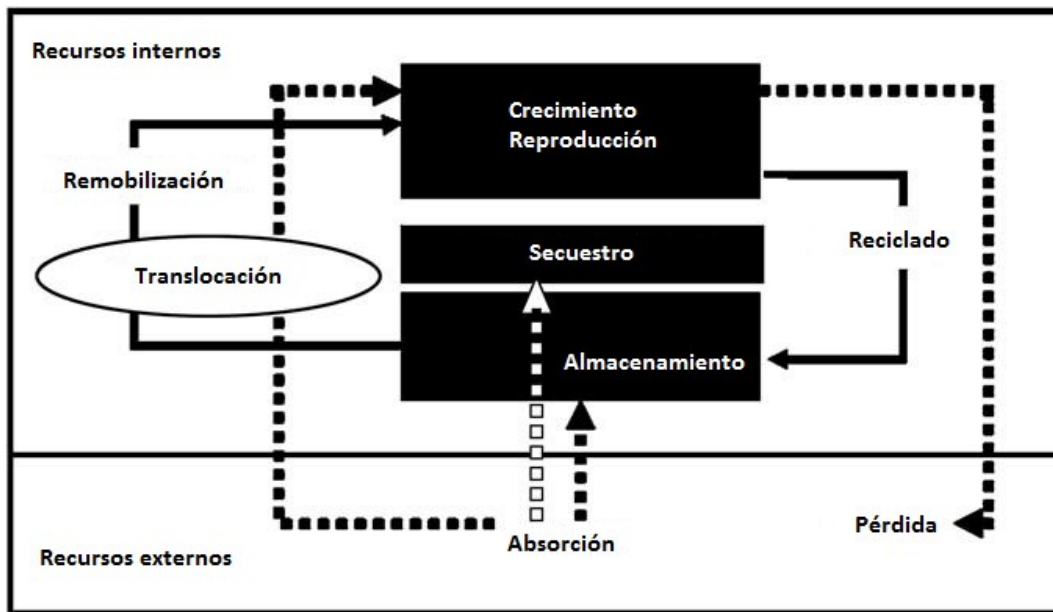


Figura 1.5. Intercambio de recursos entre las fuentes y destinos. Líneas de puntos: Destinos de los recursos externos (captación directa para el almacenamiento, secuestro, crecimiento, reproducción u otro tipo de metabolismo; pérdidas a través de la senescencia y abscisión de hojas y raíces). Líneas continuas: Ciclado interno de los recursos (removilización estacional a través de la translocación a otros tejidos para el crecimiento, reproducción u otro tipo de metabolismo). El reciclado se produce cuando los recursos son exportados de los tejidos (por lo general durante la senescencia, antes de la abscisión) para el almacenamiento. Fuente: Millard y Grelet, 2010.



Diciembre



Agosto

Figura 1.6. Diferencias debidas a la abscisión de especies de hojas caducas en los bosques de *Nothofagus* de bahía Lapataia, Ushuaia en verano (Diciembre, fuente: www.skyscrapercity.com) e Invierno (Agosto).

En las plantas anuales, donde ocurre la senescencia monocárpica, la planta entera invierte los productos de degradación en el desarrollo de estructuras reproductivas (v.g. semillas). De esta manera se facilita el desarrollo de nuevas generaciones en momentos en que el clima lo permita. Ya sea en plantas perennes o en plantas anuales, la senescencia permite reciclar componentes celulares y contribuye de manera significativa a la economía de nutrientes de las plantas.

1.2.3 Estudio de la senescencia

Como se mencionó anteriormente la senescencia implica procesos a nivel celular y a nivel de planta entera. Debido a esto, los enfoques posibles para estudiar esta problemática son diversos y por lo tanto la publicación de trabajos científicos se realiza en revistas científicas especializadas en diferentes temáticas (v.g. biología celular, agronomía, bioquímica). Esto implica

la confección de bases de datos multidisciplinarias a la hora de elaborar marcos teóricos.

Los estudios a nivel celular se centran fundamentalmente en el desmantelamiento de los cloroplastos. Los cloroplastos, además de contener clorofila contienen la mayor cantidad de proteína (especialmente Rubisco) de las hojas y por tanto son de central importancia. Los estudios que involucran la degradación de proteínas provenientes de otras organelas (v.g. mitocondrias) no abundan. Por otra parte, han sido descritos varios genes vinculados a la senescencia como también su regulación y función durante la senescencia (Jones, 2004; Woo et al., 2004).

Los estudios de senescencia a nivel de planta entera, podrían arrojar información acerca de la regulación y la interdependencia fisiológica de actividades en diferentes órganos de la planta. Esta perspectiva puede ayudar al entendimiento de la planta como un todo, especialmente en la manera en que los organismos enfocan estos recursos hacia sitios particulares o centros de movilización. La senescencia monocárpica y la recuperación de recursos desde los órganos asimilatorios probablemente incrementa el éxito reproductivo. Se ha encontrado también que la senescencia de algunos órganos y de la planta entera tiene importantes funciones adaptativas, ayudando a los organismos a hacer frente a los cambios ambientales (Noodén, 1988b).

1.3 Las Raíces

1.3.1 Conceptos generales

De acuerdo el diccionario de botánica de P. Font Quer (1970) la raíz en sentido frecuente se define como: “órgano de las plantas que crece en dirección inversa a la del tallo, no toma color verde por la acción de la luz, e introducido en tierra o en otros cuerpos, absorbe de éstos las materias necesarias para el crecimiento y desarrollo del vegetal, y adicionalmente sirve de sostén”. Esto, aunque no comprende todas las variaciones que existen en la naturaleza, resume las principales características de las raíces.

En las raíces pueden diferenciarse distintas zonas con funciones específicas (Figura 1.7a). Desde la porción apical pueden diferenciarse:

- i) Caliptra, cofia o pilorriza: se encuentra en el ápice protegiendo al meristema apical.
- ii) Zona de crecimiento o alargamiento: aquí las células generadas por el meristema apical comienzan a crecer y elongarse.
- iii) Zona pilífera o de pelos absorbentes: está es la zona de absorción de las raíces.
- iv) Zona de ramificación: se producen las ramificaciones radicales.

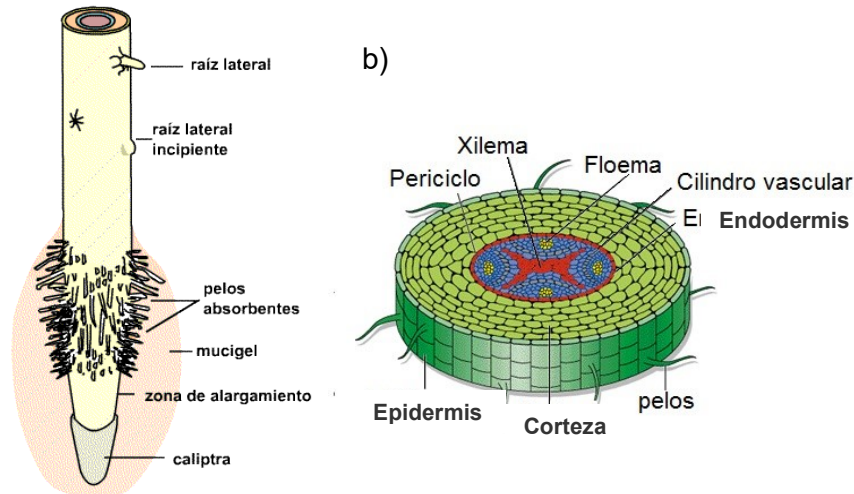


Figura 1.7: Esquema de una raíz. a) Partes de la raíz (fuente: www.biologia.edu.ar) b) Corte transversal de la raíz (fuente: modificado de <http://helen-profbio.blogspot.com.ar>)

En un corte transversal (Figura 1.7b) se pueden identificar diferentes tejidos desde el exterior al interior:

- i) Epidermis: es el tejido más externo en contacto con el sustrato y es la principal vía de entrada de agua y nutrientes, fundamentalmente a través de los pelos absorbentes.
- ii) Corteza: conformado por tejido parenquimático principalmente, vincula la epidermis con el cilindro vascular, almacena almidón y permite la aireación de las células (importante en la respiración).
- iii) Endodermis: provista de engrosamientos de suberina funciona como barrera simplástica en el movimiento de agua y nutrientes hacia los tejidos de conducción.
- iv) Periciclo: tejido desde donde se generarán las ramificaciones radicales.

- v) Tejidos de conducción: Floema (transporta especialmente compuestos orgánicos desde los órganos fotosintéticos) y Xilema (transporta mayormente agua y minerales hacia la parte aérea).

1.3.2 Funciones de las raíces

Como se mencionó anteriormente, las principales funciones de las raíces son: absorción (de agua y minerales) y sostén. Sin embargo, dependiendo de los requerimientos de las plantas, las formas de vida o las adaptaciones específicas adquiridas se pueden diferenciar algunos tipos de raíces según la función. Algunos ejemplos son: las raíces tuberosas (engrosadas a modo de tubérculo que funcionan como órgano de reserva), neumatóforos (son epígeas y cumplen la función de suministrar oxígeno a órganos subterráneos), raíces chupadoras (en las plantas parásitas), etc. Debido a que las raíces están en contacto con el sustrato en el cual estará anclada la planta, también estarán en contacto con los microorganismos que allí se encuentren. Los microorganismos pueden ser patógenos (v.g. nematodos, hongos) o también pueden ser beneficiosos y formar relaciones simbióticas (v.g. hongos que forman micorrizas, bacterias que forman nódulos nitrificantes). Desde el punto de vista fisiológico, las raíces deben realizar una inversión de energía ya sea para combatir las enfermedades como también para vincularse con organismos simbióticos, aunque en este último caso la inversión se justifica con algún beneficio en particular (v.g. facilitación de absorción de ciertos minerales, o asimilación de N atmosférico).

Funcionalmente las raíces son órganos heterotróficos ya que adquieren los productos derivados de los órganos fotosintéticos para realizar sus funciones metabólicas. Con esto queda de manifiesto que las raíces son fuertemente dependientes de los órganos fotosintéticos como también, estos lo son de las raíces ya que adquieren agua y minerales por medio de ellas.

1.3.3 Estudio de las raíces

La naturaleza del sustrato en donde las plantas se desarrollan varía de acuerdo a cada especie en particular. Así, se pueden encontrar plantas que se desarrollan en tierra, agua o aire (plantas que no se encuentran en ningún sustrato en particular), sobre otras plantas (plantas parásitas y epífitas), etc. Cada tipo de sustrato dificulta de distinta manera el muestreo de las raíces, siendo los sustratos sólidos los que más dificultades ofrecen a la hora de extraer las raíces de ellos.

Según Neumann et al. (2009), los principales retos en la investigación de la rizósfera comprenden: (i) la detección y cuantificación de la distribución de las raíces *in situ* y su recambio según las condiciones del suelo natural, (ii) el seguimiento de la actividad radicular, (iii) la caracterización de los mecanismos a nivel fisiológico y molecular, y (iv) la transformación del conocimiento en modelos fiables. Los métodos de muestreo y el diseño experimental son determinantes para superar estos desafíos.

La primera alternativa para el muestreo de raíces es extraerlas de suelo y luego lavarlas. Otra alternativa es crecer las plantas en hidroponía (donde las raíces se encuentran inmersas en un sustrato líquido) o en aeroponía (donde

las raíces se encuentran suspendidas en el aire y se les suministra solución nutritiva periódicamente por aspersión) (Sengupta y Banerjee, 2012). Cada alternativa tiene sus ventajas y desventajas. Las raíces crecidas en tierra desarrollan un sistema radical en condiciones extrapolables a la naturaleza pero el hecho de extraerlas para el muestreo inevitablemente implica la pérdida de material (v.g. raíces finas, pelos radicales). Por otro lado, crecer las plantas en hidroponía o aeroponía supone un muestreo sumamente sencillo aunque las raíces crecerán en un medio carente de estructura, con nutrientes disponibles de manera homogénea y accesible, y por tanto suelen desarrollar una morfología atípica. Además, el coste de mantenimiento es relativamente elevado (control de pH, cambio de solución nutritiva periódicamente, aireación del sustrato, mantenimiento de aspersores, etc) (Sengupta y Banerjee, 2012). De acuerdo a los objetivos buscados se deberán tener en cuenta estas cuestiones.

El uso de rizotrones es una alternativa al muestreo no destructivo para estudios en maceta o campo. Es muy útil a la hora de muestrear raíces *in situ* y seguir el crecimiento radical y la muerte o desaparición a lo largo del desarrollo (Neumen et al., 2009). Sin embargo, para obtener muestras para realizar análisis bioquímicos hay que recurrir a la extracción del suelo.

Las observaciones *in vivo* en el microscopio presentan dificultades inherentes a la estructura y morfología radical. Si las raíces son finas (como por ejemplo las raíces de *Arabidopsis thaliana*) pueden visualizarse fácilmente debido a que pueden ser atravesadas por la luz sin la necesidad de realizar cortes, pero cuando las raíces requieren de cortes para ser observadas surgen algunas dificultades. Si la parte a observar son los ápices, los tamaños

celulares permiten realizar cortes sin dañar demasiado las células, pero cuando se requiere analizar una sección de la raíz madura, la forma alargadas de las células torna casi inevitable la pérdida del lumen celular y destrucción de la estructura de los tejidos.

1.4 Las mitocondrias

1.4.1 Evolución del concepto de “mitocondria”

La denominación “mitocondria” deriva de los términos griegos *mitos* (hilo) y *chondros* (grano) y fue acuñado por Benda (1898). Durante los años 1880-1910, las mitocondrias habían sido observadas por varios investigadores en una gran variedad de tipos celulares, pero su función no había sido establecida. Algunos científicos postularon que las mitocondrias estarían involucradas en la fertilidad y en la herencia por encontrarse en gran número en los espermatozoides. También fue propuesta una función relacionada con la oxidación celular, como Altmann en 1886, idea que fue ganando aceptación con el correr de los años. En 1913, Warburg demostró que la oxidación de metabolitos estaba asociada con elementos granulares insolubles de la célula pero sin relacionar estos gránulos con las mitocondrias. El rol primario de las mitocondrias fue establecido finalmente en 1949, cuando Kennedy y Lehninger mostraron que las mitocondrias eran el sitio del metabolismo energético oxidativo (Scott y Logan, 2007)

Desde la década de 1890 Altmann propuso por primera vez la teoría endosimbiótica del origen de las mitocondrias basándose en la similitud de forma y tamaño con bacterias de vida libre. Luego con el devenir de los años y los avances en las técnicas de estudio, se han podido recoger pruebas que avalaron esta teoría. Entre estas pruebas se puede mencionar: la presencia de doble membrana, la presencia de un genoma propio, el tipo de división y proteínas involucradas, entre otras (Scott y Logan, 2007). A partir de esto

podría entenderse a las mitocondrias como organismos co-dependientes con la célula eucariota.

1.4.2 Las mitocondrias vegetales

Desde el punto de vista morfológico, el condrioma vegetal (conjunto de las mitocondrias) comprende estructuras altamente dinámicas y mayormente discretas, a diferencia de otros organismos (vg. animales y hongos) donde el condrioma se encuentra formado por estructuras tubulares a modo de retículo (Scott y Logan, 2007). Por otro lado, desde el punto de vista funcional y en contraste con otros organismos, la mitocondrias vegetales se encuentran en células que: (1) contienen cloroplastos, que junto con las mitocondrias sintetizan Adenosín trifosfato (ATP) y una gran parte de sus propios sustratos respiratorios; (2) carecen de la capacidad de escapar muchas situaciones de estrés ambiental; (3) producen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios; (4) participan de un proceso denominado fotorespiración (Mackenzie y McIntosh, 1999) y (5) presentan una vía respiratoria alternativa. Esto indica que las mitocondrias vegetales han evolucionado de manera particular en las células fotosintéticas tanto en su composición bioquímica como en su funcionamiento.

En las células vegetales las mitocondrias y los cloroplastos son los principales centros energéticos y metabólicos. Estos son frecuentemente mencionados como organelas semiautónomas debido a que contienen un genoma propio. Las mitocondrias funcionan a modo de “estación energética” llevando a cabo los procesos que implican la fosforilación oxidativa. Este

proceso, opera acoplado al transporte de electrones a través de los complejos respiratorios (I, II, III y VI) generando un gradiente de protones entre la matriz y el espacio intermembrana que actuará de fuerza impulsora de la generación de ATP a través del complejo de la ATP sintasa (Complejo V) (Figura 1.8). La producción de ATP y de poder reductor, y la síntesis de esqueletos carbonados son las principales funciones de las mitocondrias (Atkin et al., 2000).

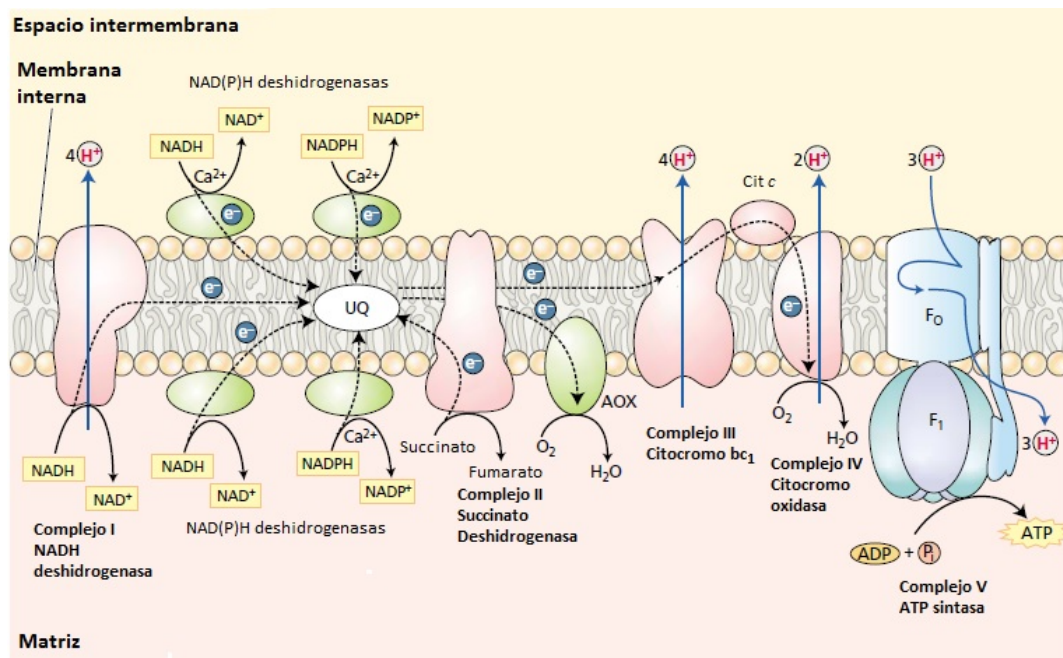


Figura 1.8. Organización de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y síntesis de ATP en la membrana interna mitocondrial. Adicionalmente a los 5 complejos estandar (I, II, III, IV y V) presentes en los eucariotas, las plantas poseen 5 enzimas adicionales (marcadas en verde): las NAD(P)H deshidrogenasas y la AOX (Oxidasa Alternativa). La UQ (ubiquinona) y Cit c (citocromo c) transfieren electrones hacia el complejo III y IV respectivamente. Modificado de Taiz y Zeiger, 2003.

En las plantas, el papel del ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) difiere de los organismos heterótrofos. Debido a su naturaleza autótrofa, las plantas sintetizan sus propios sustratos respiratorios, que luego actuarán como reactivos del CAT. Además de la síntesis de ATP y de poder reductor en forma de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotido) y FADH₂ (Flavina Adenina Dinucleótico), el CAT es un punto de divergencia de

las vías anabólicas y proporciona precursores para muchos procesos biosintéticos, tales como la fijación de nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos (Steuer et al., 2007).

Las mitocondrias también son el sitio de síntesis y degradación de diversas biomoléculas. Ejemplos de esto son la síntesis y degradación de ácidos grasos, la síntesis y exportación de complejos ferrosulfurados y de la degradación de aminoácidos ramificados y fitol, entre otros (Nunes-Nesi y Fernie, 2007). También son el asiento de síntesis de vitaminas y antioxidantes como, por el ejemplo, el ácido ascórbico (Bartoli et al., 2000).

Las mitocondrias vegetales se diferencian también de las de muchos otros organismos ya que poseen una enzima denominada Oxidasa Alternativa (AOX, del inglés “Alternative Oxidase”). Esta se localiza en la membrana interna mitocondrial, funcionalmente es un dímero, y es capaz de reducir O_2 y producir H_2O pero sin bombear protones hacia el espacio intermembrana (Møller, 2007). La AOX esta implicada en procesos relacionados con el estrés oxidativo y la muerte celular programada y es la causante de la resistencia de las plantas al cianuro (Diamond y McCabe, 2007).

1.4.3 Estudio de las mitocondrias

Los estudios acerca de la morfología y comportamiento de las mitocondrias *in vivo* se remontan a los principios del siglo XX cuando Lewis y Lewis en 1914 describieron cambios en el tamaño, forma y posición dentro del citoplasma usando un microscopio de campo claro. Los avances en microscopia, particularmente la técnica de contraste de fases en 1934,

permitieron tener conocimientos acerca del movimiento de las mitocondrias en la célula. En 1941 Michel pudo mostrar por primera vez un rápido movimiento de las mitocondrias durante la meiosis (Ross, 1967). Sin embargo, el contraste de fases no permite identificar de manera inequívoca a las mitocondrias (Scott y Logan, 2007).

La aparición del microscopio electrónico a finales de la década del 1920 supuso grandes avances en el estudio de la ultraestructura celular, pero no fue hasta las década de 1950 que se describió por primera vez la ultraestructura mitocondrial en imágenes de microscopía electrónica. Palade en 1952 publica por primera vez microfotografías electrónicas de transmisión de mitocondrias de diversos tejidos (vg. hígado, músculo, tejidos nerviosos, epitelios) donde describe por primera vez: a) una membrana que las separa del citoplasma, b) un sistema de crestas internas y c) una matriz.

La microscopía de fluorescencia se ha convertido en las últimas décadas en una herramienta importante en el estudio *in vivo* de las mitocondrias. Los fluorocromos específicos de mitocondrias (v.g. rhodamina 123, mitotracker red) son ampliamente usados para la observación de mitocondrias, sin embargo tienen la desventaja de ser citotóxicos y susceptibles al fotoblanqueo (Scott y Logan, 2007). La utilización de la expresión nuclear de proteínas fluorescentes (v.g. GFP “green fluorescent protein”, YFP “green fluorescent protein”) fusionadas a secuencias de señalización hacia las mitocondrias permitió realizar análisis con menor posibilidad de error, en forma no invasiva, en tiempo real y en tejidos vivos (Scott y Logan, 2007).

Desde el punto de vista fisiológico pueden estudiarse a las mitocondrias desde varios enfoques. De manera global puede cuantificarse el consumo de

O₂ de los tejidos a estudiar. Este enfoque tiene complicaciones en ciertos tejidos, como los fotosintéticos, en donde los cloroplastos producen oxígeno mientras que las mitocondrias lo consumen y en donde se producen procesos como la fotorrespiración. Una de las alternativas es realizar mediciones en oscuridad, aunque la luz influye en el metabolismo global celular, con lo que esto no es reflejo del metabolismo “real” a la luz (Hurry et al., 2005). Por otro lado, las mediciones en tejidos no fotosintéticos (v.g. las raíces) no suponen inconvenientes. Por otro lado, las mitocondrias pueden estudiarse de manera aislada obteniendo estudios más específicos.

1.5 Objeto de estudio de la presente tesis

1.5.1 Vacíos en el conocimiento del proceso de senescencia

Como ya se mencionó anteriormente, la senescencia comprende diversos procesos fisiológicos que están involucrados en la remoción y traslado de sustancias. Se ha estudiado extensamente la senescencia de las hojas y flores, pero se han desatendido otros órganos como las raíces. La pérdida de funciones de las raíces durante el desarrollo de la planta involucra una reducción en la captación de nutrientes y en la producción de hormonas relacionadas con el crecimiento y división celular, como por ejemplo las citocininas (Nooden, 1990; Nooden y Letham, 1993).

Como resultado del énfasis puesto en la senescencia foliar, la mayoría de los estudios se han focalizado en el desmantelamiento de los cloroplastos, por ser ellos la principal fuente de nitrógeno y compuestos carbonados redistribuibles desde las hojas senescentes a otros órganos en crecimiento. Son escasos los estudios sobre las modificaciones que ocurren durante el envejecimiento en otras organelas, particularmente en las mitocondrias. La escasa producción científica sobre los cambios fisiológicos que ocurren durante la senescencia monocárpica en las raíces y sobre las modificaciones que tienen lugar en las mitocondrias queda de manifiesto observando la casi ausente participación de estos temas en los libros que han aparecido sobre senescencia vegetal en las últimas dos décadas (v.g., Nooden y Leopold, 1988; Nooden, 2004; Gan, 2007).

Por otro lado, esto puede observarse en las bases de datos científicas. Por ejemplo, tomando como referencia Scopus (www.scopus.com), al realizarse una búsqueda de trabajos científicos en ciencias de la agricultura y biológicas, con la palabra “*senescence*” (senescencia) como palabra clave arrojará unos 4800 resultados, sin embargo al sumar la palabra “*roots*” (raíces) los resultados descienden a 237. Esto muestra que en las palabras claves menos del 5% de los trabajos en senescencia tienen en cuenta o prestan central atención a las raíces o viceversa. También hay que considerar que la mayoría de los trabajos incluidos en este 5%, no tratan realmente de los cambios metabólicos de las raíces durante la senescencia sino de la muerte de células radicales durante algún tratamiento específico. También es importante resaltar que trabajos que no aparecen en la base de datos bien podrían aportar información en este aspecto (v.g. Malik, 1983).

La muerte celular programada y la participación de las mitocondrias en su regulación, han recibido considerable atención recientemente, pero en este proyecto el énfasis está puesto en eventos degradativos que ocurren previamente a la muerte programada de las células.

1.5.2 ¿Senescencia en raíces?

Es claro que en las especies anuales varias funciones de las raíces (v.g., asimilación de nutrientes, fijación biológica de N en las leguminosas, producción de citocininas) declinan durante el período reproductivo (Noodén et al., 1990; Sheehy et al., 2004), sin embargo no es claro en qué medida estos cambios son parte de un programa de desarrollo de las raíces. Por ejemplo, la

declinación de la fijación del N atmosférico en leguminosas aparentemente se produce por un menor aporte de fotosintatos por los vástagos senescentes (Malik, 1983). Sin embargo, es evidente que ocurre un desmantelamiento celular también en las raíces, dado que la redistribución de N almacenado en los tejidos radicales puede aportar alrededor del 10% del N cosechado en los granos a la madurez de algunos cultivos (Peoples y Dalling, 1988). En el desmantelamiento celular en las raíces, la degradación de las mitocondrias probablemente constituye un evento muy importante, ya que presumiblemente las mitocondrias contienen una fracción importante de las proteínas en las células de la raíz.

Ni las modificaciones que ocurren en las raíces durante la senescencia monocárpica, ni el control de estos cambios han sido estudiados en profundidad hasta el presente.

1.5.3 Hipótesis y objetivos

La hipótesis que se va a contrastar en este estudio es que las mitocondrias experimentan diversas modificaciones estructurales y funcionales que contribuyen a la función de hojas y raíces durante la senescencia de la planta, y que la degradación de mitocondrias en los órganos senescentes involucra una vía autofágica.

Objetivos

Objetivo general: Determinar modificaciones funcionales y estructurales de las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces.

Objetivo específico 1: Caracterizar las alteraciones en el crecimiento y funcionamiento de las raíces en plantas de *Arabidopsis thaliana* a partir de la aparición visible del tallo floral, y en los estadios reproductivos post-floración de soja (*Glycine max*).

Objetivo específico 2: Caracterizar la actividad mitocondrial al inicio y durante la senescencia de raíces.

Objetivo específico 3: Examinar los procesos probablemente involucrados en la degradación de mitocondrias durante la senescencia en raíces.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal y Cultivos en hidroponía

2.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col) y líneas transgénicas (mt-YFP) con un inserto de *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) fusionada a los 29 primeros aminoácidos de la Citocromo C oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* (ScCOX4; Köhler et al., 1997) con direccionamiento a mitocondrias (línea mt-yk CS16264, Nelson et al. 2007). Las plantas fueron cultivadas en hidroponía según Norén et al. (2004) con las modificaciones que se detallan a continuación. Se utilizó una solución nutritiva compuesta por 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 20 μM FeNaEDTA, 5 μM H_3BO_3 , 0,9 μM MnCl_2 , 0,8 μM ZnCl_2 , 0,3 μM CuSO_4 y 0,01 μM Na_2MoO_4 (modificado de Leggett y Frere, 1971). Las semillas fueron sembradas en *tips* de 200 μl sellados en su base y rellenos con solución nutritiva diluida al 50% en agar 0,7% (dejando un menisco que sobresalga del tip) (Figura 2.1a) en un caja sellada y con paños de papel mojados para mantener una humedad relativa cercana al 100% (Figura 2.1b). Estas cajas se colocaron durante 4 días en una cámara a 4 °C y luego se llevaron a una cámara de cultivo (fotoperíodo de 8 horas y temperatura de 22°C) por 10 días hasta que desarrollaron 4 hojas. Posteriormente, a cada *tip* se le cortó la punta sellada y se lo colocó durante 2 semanas en un recipiente con solución nutritiva (teniendo especial cuidado en que la solución esté en contacto con el agar) y con paños de papel mojado y sellado con film de PVC para continuar manteniendo la humedad cercana al 100% (Figura 2.1c). Luego, las plantas

fueron aclimatadas paulatinamente a humedad ambiente. Para ello el film fue agujereado 2 ó 3 días antes de este pasaje. A continuación, cada planta fue colocada en recipientes individuales con 400 ml de solución nutritiva y aireación (Figura 2.1d). Las plantas fueron mantenidas en estas condiciones por cuatro semanas antes de comenzar los ensayos (Figura 2.1e).

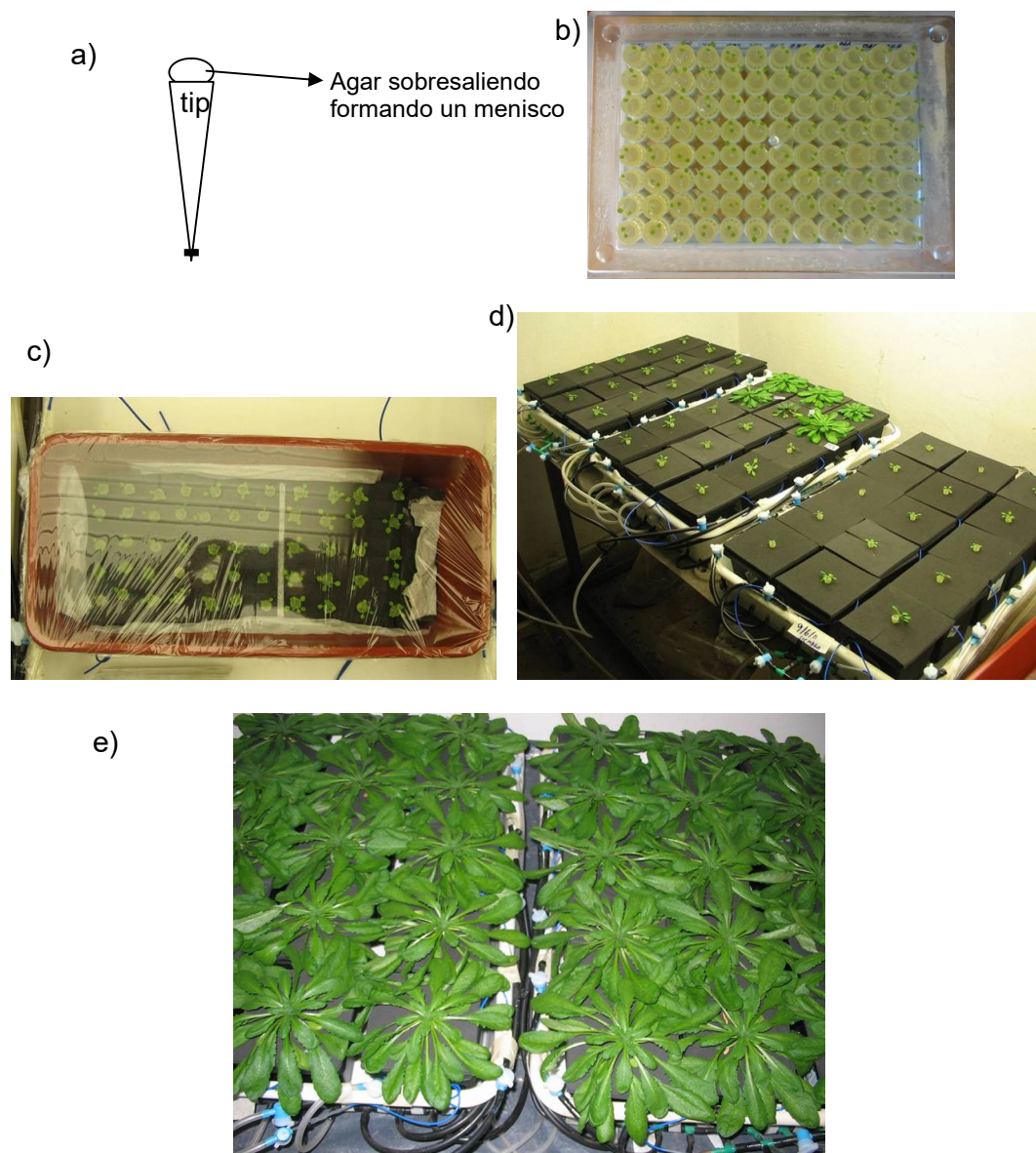


Figura 2.1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en hidroponia. a) Esquema de un *tip* con agar donde se sembraron las semillas. b) Caja de tips de 200 μ l con plantas ya germinadas en agar. c) Plantas en solución nutritiva con humedad cercana al 100%. d) Plantas en recipientes de 400 ml en humedad ambiente y con aireación. e) Plantas de 8 semanas de edad.

El pH de la solución nutritiva se midió periódicamente y se realizó un cambio total de la solución cuando el valor del mismo se excedía del rango comprendido entre 5,0-6,5 o a los 20 días. El volumen de solución fue repuesto periódicamente con agua destilada para evitar desbalances en la proporción de nutrientes. El fotoperíodo fue de 8 horas de luz y 16 hs de oscuridad, y la temperatura de 22°C.

2.1.2 Soja (*Glycine max* L.Merr.)

Semillas del cultivar Williams 82 fueron sembradas en vermiculita a mediados del mes de enero y puestas en una incubadora a 30°C en oscuridad por tres días. Luego fueron transportadas a un invernáculo climatizado con temperaturas máximas comprendidas entre 25°C y 39°C, y mínimas entre los 10°C y 15°C (Figura 2.2), y con una irradiancia con máximas que variaron entre los 300 y 700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ entre los meses que duró el ensayo (Figura 2.3). Los registros más elevados de irradiancia a partir del mes de abril se deben a la extracción de una media sombra reflectante (50% de transmitancia) colocada en el techo del invernáculo para moderar las altas temperaturas.

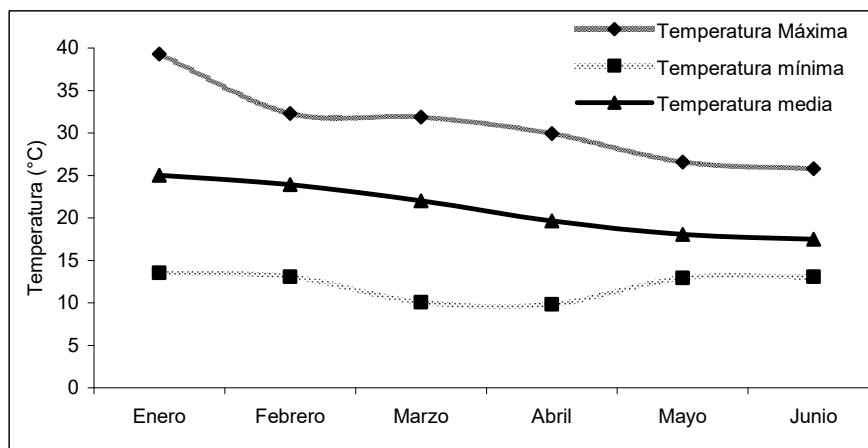


Figura 2.2. Registro de temperaturas máximas, mínimas y medias en los meses en que se llevó a cabo el ensayo con soja.

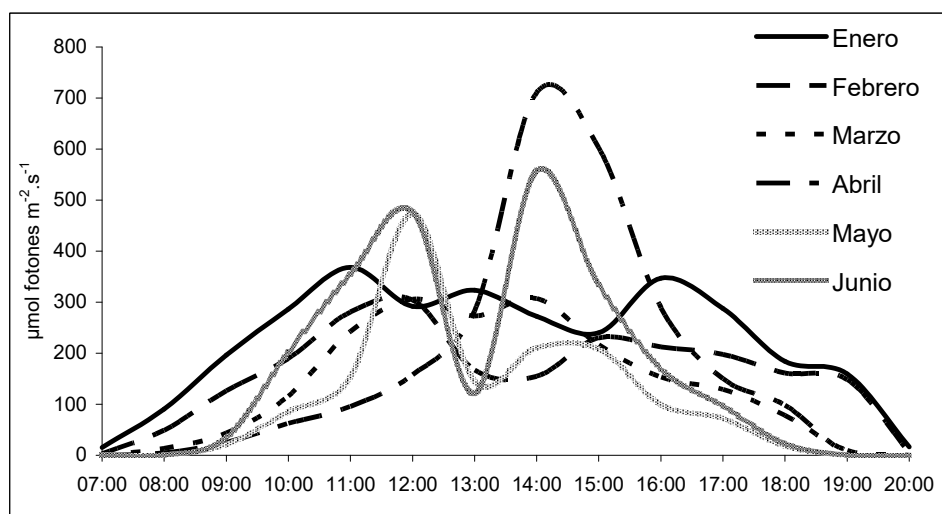


Figura 2.3. Registro de irradiancias medias por hora en los meses en que se llevó a cabo el ensayo con soja.

Luego de 15 días postsiembra, al alcanzar el desarrollo de la primera hoja trifoliolada, las plantas fueron transplantadas a recipientes de 5 litros con solución nutritiva con la siguiente formulación: 1,7 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,7 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 20 μM FeNaEDTA , 5 μM H_3BO_3 , 0,9 μM MnCl_2 , 0,8 μM ZnCl_2 , 0,3 μM CuSO_4 y 0,01 μM Na_2MoO_4 (modificada de Leggett y Frere, 1971). Se utilizaron sales comerciales no analíticas cuya pureza fue analizada en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias

Agraria y Forestales (FCAyF-UNLP). Las plantas fueron sostenidas en la tapa de cada recipiente con gomaespuma y luego fueron colocados tutores de hilo tomados del techo del invernáculo para mantenerlas erguidas. La solución nutritiva se cambió periódicamente y el volumen de agua consumido fue repuesto y medido. Un esquema completo del cultivo de soja en hidroponía puede observarse en la Figura 2.4.

Se analizaron los estadios fenológicos descritos por Fehr et al. (1971) en los cuales se tomaron repeticiones de entre 4 y 8 plantas.

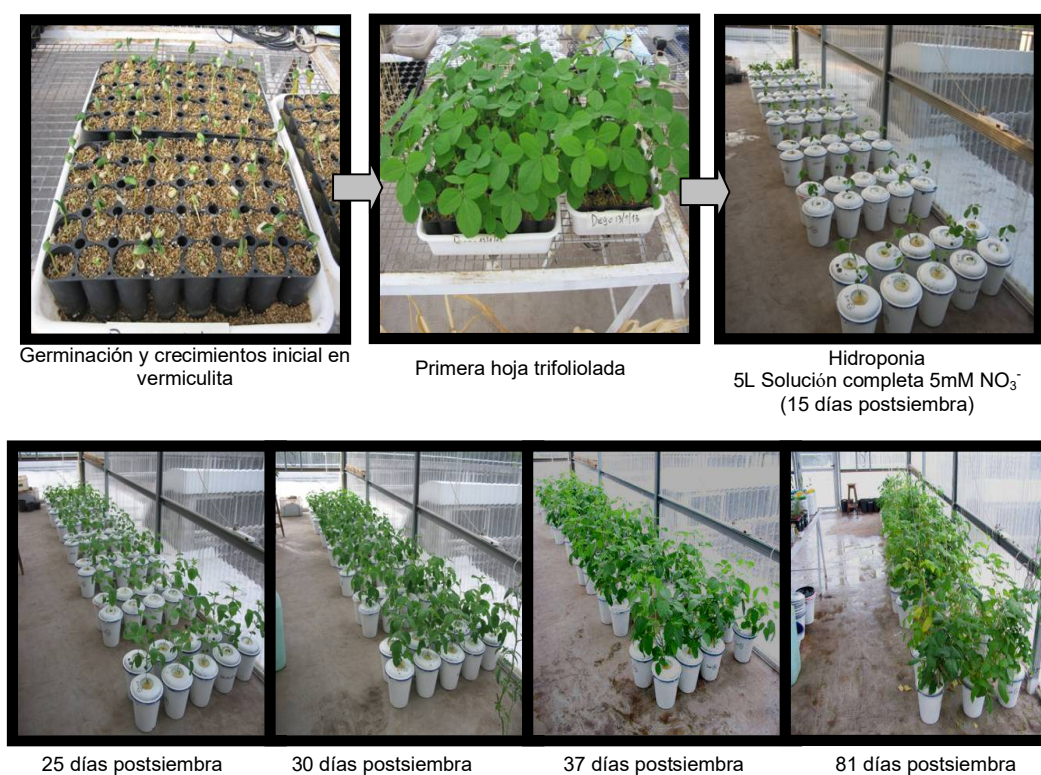


Figura 2.4. Progreso en el crecimiento del cultivo hidropónico de soja.

2.2 Consumo de O₂

El consumo de O₂ (i.e., respiración) fue medido con un electrodo tipo Clark (Hansatech, UK) en fase gaseosa dentro de una cámara hermética (Figura 2.5). La medición consistió en tomar los valores de caída de voltaje por minuto registrados con el electrodo por el lapso de 5 minutos (min). Para *Arabidopsis thaliana* fue utilizado el sistema radical completo de cada planta y para las plantas de soja se utilizó aproximadamente 1 gramo (g) de raíz correspondiente a la sección distal de la raíz respecto de la parte aérea (Figura 2.6). Las mediciones fueron llevadas a cabo a 25°C y se registraron las temperaturas de la solución nutritiva, de la cámara de cultivo (en el caso de *Arabidopsis thaliana*), y del invernáculo (en el caso de soja) previo a la medición. Todas las mediciones fueron tomadas en el mismo rango horario, entre las 14:00 hs y las 17:00 hs.

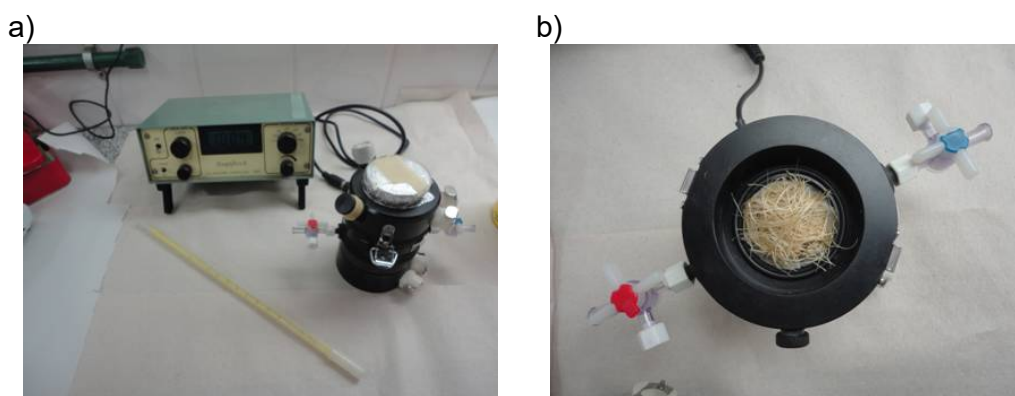


Figura 2.5. Medición del consumo de oxígeno. a) Electrodo tipo Clark y registrador de voltaje. b) Raíces en la cámara de medición.

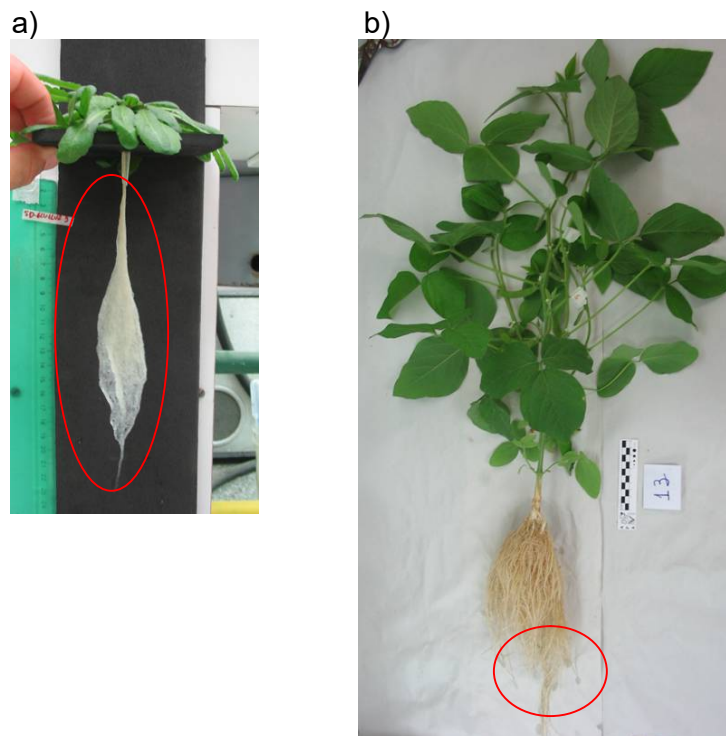


Figura 2.6. Material vegetal utilizado para la medición de consumo de Oxígeno. En rojo se enmarca la fracción del sistema radical que fue utilizada en las mediciones de consumo de oxígeno en *Arabidopsis thaliana* (a) y soja (b)

2.3 SDS-PAGE y Western Blots

Las raíces de cada tratamiento fueron cosechadas y congeladas en N₂ líquido y conservadas a -80°C. Luego se realizaron extractos en *buffer* bicina 0,1 M pH 7,5, EDTA (ácido etildiaminotetraacético) 1 mM, glicerol 10% v/v, cisteína 4 mM, PVPP (polivinilpirrolidona) 1% p/v e inhibidores de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0,004 % p/v y Leupeptina 0,001 % p/v. Fueron utilizados 1ml de buffer cada 200 mg de tejido. Los extractos fueron centrifugados a 1500 g por 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se utilizó para la realización de los análisis bioquímicos.

Las proteínas se analizaron con SDS-PAGE según Laemmli, (1970) en geles de 2 mm de espesor de poliacrilamida 12% p/v. Los sobrenadantes obtenidos fueron diluidos 1:1 en “*sample buffer*” 2x 6 M Urea. Luego en los geles se sembró el equivalente a 4,5 mg de peso fresco de tejido por calle. Algunos geles fueron teñidos con *Coomassie Blue* (Sigma) y el resto fueron utilizados para realizar Western Blots. Para estos últimos, primero se realizó una electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa y luego la misma fue bloqueada con leche descremada 10% p/v en PBST(NaH₂PO₄ 1,5 mM, NaHPO₄ 9,7 mM, NaCl 145 mM y Tween-20 0,05% v/v; pH 7,4) por una noche. Pasado este período de tiempo, se efectuaron 3 lavados de 5 minutos con PBST para posteriormente incubar la membrana con los anticuerpos primarios (Tabla 2.1). A continuación de la incubación con los anticuerpos primarios se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBST y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario. Luego las membranas se lavaron 5 veces para realizar la reacción quimioluminiscente. Esta última fue llevada a

cabo con 25 μ l de ácido cumárico (15 mg/ml DMSO), 50 μ l luminol (44mg/mlDMSO) y 5 μ l de H₂O₂ 30% v/v en 10 ml de *buffer* Tris 0,1 M pH 8,5.

Una vez obtenidos los geles de proteínas y los Western blots, los mismos se analizaron con el programa Image J (versión 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) con la función “*gels analyse*” y se realizó una cuantificación relativa al valor mayor de área de ploteo.

Tabla 2.1. Anticuerpos utilizados para la realización de Western-Blots.

Anticuerpo	Preparación	Origen	Tipo	Propiedades biológicas
Anti-COX2	1:2500 en 1% BSA en PBST	Suero cedido por el Dr. Daniel Gonzalez (Universidad Nacional del Litoral)	Policlonal	Reconoce a la proteína COX2 del complejo mitocondrial IV (Citocromo C Oxidasa) (Attallah et al., 2011)
Anti-NAD9	1:50000 en 2% leche en PBST	Liofilizado cedido por la Dr. Geraldine Bonnard (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes)	Policlonal	Reconoce a la proteína NAD9 del complejo mitocondrial IV (Citocromo C Oxidasa) (Laloi et. al, 2001)
Anti-ALLCAs	1:1000 en 2% leche en PBST	Suero cedido por el Dr. Eduardo Zabaleta (Instituto de Investigaciones Biológicas, CONICET- UNMdP)	Policlonal	Reconoce a 7 péptidos correspondientes a la Anhidrasa Carbónica que forma parte del complejo 1 mitocondrial (Perales et al., 2004)
Anti-Oxidasa Alternativa	2:5000 en 2% leche en PBST	Suero cedido por el Dr. Thomas E. Elthon (Plant Research Laboratory and Biochemistry Department, Michigan State University)	Monoclonal	Reconoce a la Oxidasa alternativa que recibe electrones del ubiquinol. (Elthon y McIntosh, 1986)

2.4 Metabolismo del nitrógeno

2.4.1 Consumo de nitratos

El consumo de nitratos se calculó en base a la diferencia de concentración en la solución nutritiva en un período de tiempo determinado. En soja, se midió sobre la solución nutritiva con la formulación original y el período de consumo fue de 3 días. También fueron realizados controles que consistieron en una muestra de 5ml de la solución nutritiva en el tiempo inicial en un tubo Falcon de 15 ml que me mantuvo cerrado en el balde durante el periodo de consumo (Figura 2.7). Para *Arabidopsis thaliana* se utilizó una concentración de nitratos a 1 mM y el período de consumo fue de 1 a 2 días. Pasado el período de consumo, se repuso el volumen de agua consumido por evapotranspiración tanto para soja como para *Arabidopsis thaliana*. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro a 220 nm, en cuba de cuarzo y se realizó un factor de corrección a 275 nm según APHA, AWWA y WPCF (1985).

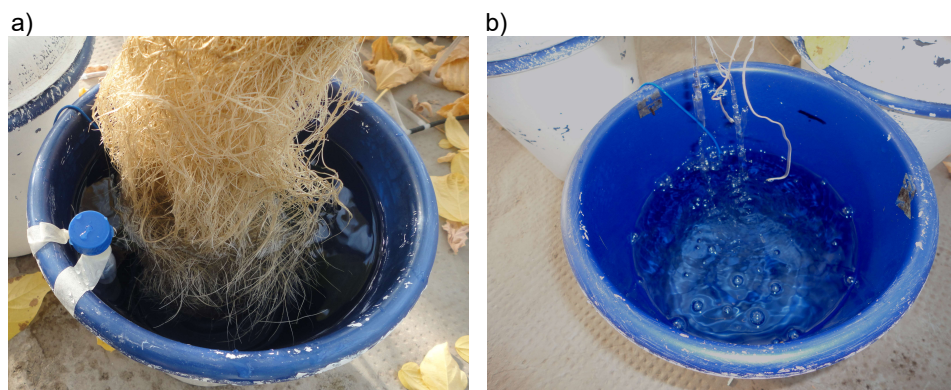


Figura 2.7. Toma de muestra para la cuantificación de NO_3^- . a) Tiempo inicial donde se muestra el control (tubo Falcon). b) Tiempo final donde se muestra la diferencia en el volumen respecto del inicial (representado por la marca en negro); antes de tomar la muestra, se llevó a volumen con agua a nivel de la marca.

2.4.2_Actividad Nitrato Reductasa

La actividad nitrato reductasa (NR) se determinó de acuerdo a Deane-Drummond et al. (1979) con modificaciones (Figura 2.8) para soja. Como medio de incubación fue utilizado *buffer* de fosfatos 50 mM, 1% de propanol (v / v), 100 mM de nitrato de potasio a pH 8,0. Las raíces fueron seccionadas en segmentos de 1 cm aproximadamente, luego fueron transferidas a tubos de 50 ml que contenían medio de incubación (20 ml / 500 mg de raíz) e infiltradas en vacío por 4 minutos. Los tubos fueron incubados durante 30 y 60 minutos a 27°C en oscuridad y la reacción fue finalizada por ebullición durante 10 minutos. Se tomaron dos muestras por planta, una correspondiente al tiempo inicial (30 minutos) y otra para el tiempo final (60 minutos). A continuación, una vez enfriados los tubos se tomó una alícuota de 0,5 ml de *buffer* de incubación al cual se le adicionó 0,5 ml de sulfanilamida 1% p/v en HCl 3 N y 0,5 ml de NNEDA 0,05% p/v (N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato) y se homogeneizó por vórtex durante unos segundos. Pasadas dos horas, se agitaron nuevamente los tubos y se cuantificó la concentración de NO_2^- en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 540 nm. La curva de calibración se realizó como se puede visualizar en la tabla 2.2, para lo cual se utilizó como estándar una solución de KNO_2 de concentración 0,1 mM. Una vez obtenida la concentración de nitritos, se calculó la producción de nitritos como la cantidad de nitrito producida en el lapso de 30 minutos entre las muestras incubadas a 30 minutos y aquellas incubadas 60 minutos pertenecientes al mismo sistema radical.

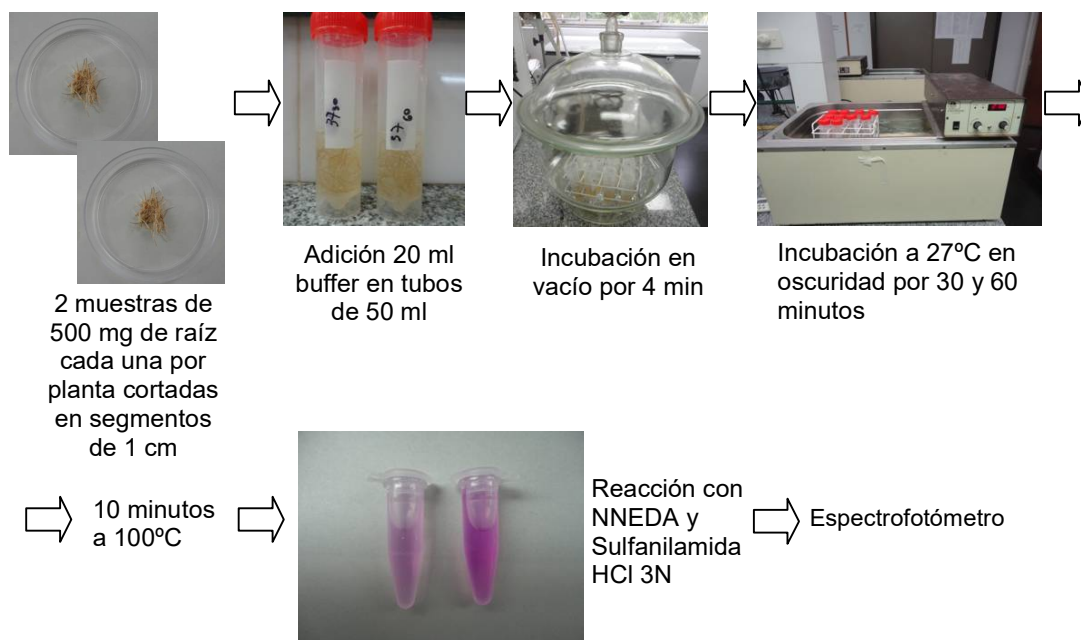


Figura 2.8. Protocolo de medición *in vivo* de la actividad nitrato reductasa calculada como la producción de nitritos.

Tabla 2.2. Composición de la mezcla de reacción para la curva de calibración para la medición de NO_2^- con la reacción de la NNEDA y Sulfanilamida

KNO_2 0,1mM (μl)	0	30	60	150	300
Buffer de incubación (μl)	500	470	440	350	200
Sulfanilamida 1% en HCl (μl)	500	500	500	500	500
NNEDA 0,05% (μl)	500	500	500	500	500
Concentración final ($\mu\text{g NO}_2^-/\text{ml}$)	0	0,092	0,184	0,460	0,920

Las mediciones en *Arabidopsis thaliana* se realizaron de manera semejante pero con la utilización de otros reactivos. El *buffer* de incubación fue compuesto por 40 mM de KNO_3 , 0,08 M Na_2HPO_4 , 0,02 M NaH_2PO_4 y n-propanol 4 % (v/v) (Yu et al., 1982). Los reactivos utilizados para la reacción colorimétrica fueron el reactivo de Zambelli (260 mL/l de HCL concentrado, 500 mL/l de agua destilada, 5,0 g/l de ácido sulfanílico, 7,5 g/l de fenol y 135 g/l de NH_4Cl) y amoníaco concentrado (26 %). Para el patrón de calibración se utilizó una solución estándar de NaNO_2 2,5 ppm y se realizaron diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 2.3. Se cuantificó la concentración de NO_2^- en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 435 nm. Las reacciones, a diferencia del protocolo seguido en soja, no fueron detenidas por la incubación en ebullición y fueron tomadas muestras a tiempos específicos de los mismos tubos a intervalos de 30 minutos. Las muestras fueron incubadas 10 minutos con el reactivo de Zambelli y luego se les añadió el amoníaco concentrado.

Tabla 2.3. Composición de la mezcla de reacción para la curva de calibración para la medición de NO_2^- con la reacción de Zambelli.

NaNO_2 2,5 ppm (μl)	0	20	100	200	300	400	500
Buffer de incubación (μl)	1000	980	900	800	700	600	500
Reactivo de Zambelli (μl)	40	40	40	40	40	40	40
Amoníaco concentrado (μl)	40	40	40	40	40	40	40
Concentración final (ppm)	0	0,049	0,245	0,490	0,735	0,980	1,157

2.5 Microscopia confocal y de epifluorescencia

Para las observaciones se seccionó la parte distal de la raíz respecto de la base de la roseta y se incubó 20 minutos en Mitotracker Red CMXRos (MT) 0,5 μ M. De esta manera fueron detectadas las mitocondrias activas (Macho et al. 1996). Las muestras fueron visualizadas con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5 donde se utilizó un objetivo de 60x (apertura numérica 0,75) en aceite de inmersión. El Mitotracker fue excitado con el Laser HeNe a 543nm y la luz de emisión fue detectada en el rango de 596nm - 680nm. Por otro lado, para la detección de YFP las raíces fueron excitadas con el Laser Arg a 514nm y la luz de emisión fue detectada en el rango de 524nm - 550nm.

Fueron tomadas secciones ópticas equivalentes en profundidad respecto del haz vascular y en vista tangencial respecto al eje mayor radical (Figura 2.9). La cuantificación de las mitocondrias fue realizada con el programa de libre acceso Image J (versión 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) de manera estándar de acuerdo a los siguientes pasos: 1) determinación del umbral de detección (*threshold*); 2) cuantificación usando la opción análisis de partículas (*analyze particle*) y 3) toda la información fue transferida a planillas de cálculo para su análisis de cuantificación por tamaños e intensidades.

Los análisis de colocalización se realizaron con el *plugin* JACoP (Bolte y Cordelieres, 2006) para el programa ImageJ. Se calculó el coeficiente de solapamiento de Manders que se basa en el coeficiente de correlación de Pearson (Manders et al., 1992). Este coeficiente puede variar entre 0 y 1, donde 0 corresponde al no solapamiento y 1 refleja 100% colocalización entre dos imágenes correspondientes a canales distintos (por ejemplo rojo y verde).

M1 se define como una relación entre “la suma de los píxeles de la imagen verde para los que la intensidad en el canal rojo está por encima de cero respecto de la intensidad total en el canal verde” y M2 se define recíprocamente para el rojo (Figura 2.10). Por lo tanto, M1 (o M2) es un buen indicador de la proporción de la señal coincidente del canal verde correspondiente al canal rojo sobre su intensidad total. El coeficiente de Manders es muy sensible al ruido. Para eludir este límite, M1 y M2 se calculó respecto del *threshold* fijado para el análisis de cuantificación.

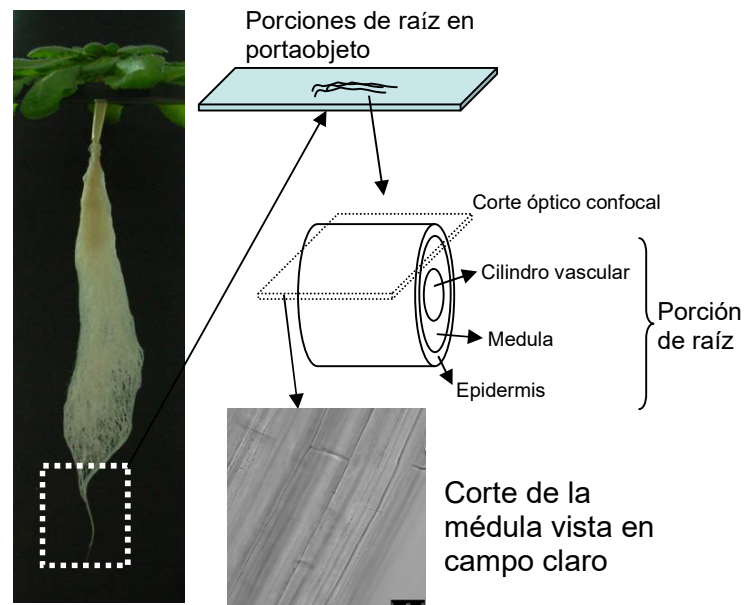


Figura 2.9. Segmentos de raíz y secciones ópticas muestreadas y analizadas en el microscopio confocal.

$$M_1 = \frac{\sum_i A_{i,coloc}}{\sum_i A_i} \quad M_2 = \frac{\sum_i B_{i,coloc}}{\sum_i B_i}$$

Figura 2.10. Formulas del coeficiente de Manders M1 y M2. A_i y B_i son los valores de intensidad de los píxeles en el canal A y B respectivamente y $A_{i,coloc}$ son los píxeles del canal A para los que la intensidad en el canal B es por encima de cero, y $B_{i,coloc}$ son los píxeles del canal B para los que la intensidad en el canal A es por encima de cero. Modificado de Bolte y Cordelières (2006)

Las observaciones de epifluorescencia fueron llevadas cabo con un microscopio Olympus® BX-51 con dos cubos de fluorescencia, uno con máximos de excitación/emisión de 545/580 nm utilizado para observar MT y otro con máximos de excitación/emisión de 470/525 nm utilizado para ver YFP. Se dispuso de una cámara digital Olympus® A330 adaptada al microscopio para la capturar imágenes. Gran parte de los experimentos preliminares de esta tesis fueron realizados con microscopía de epifluorescencia previo a la observación en el microscopio confocal.

2.6 Cuantificación de almidón y azúcares solubles

El contenido de almidón se determinó de acuerdo al método enzimático 2 descrito según Rose et al. (1991) con modificaciones y los azúcares solubles se determinaron según Costa et al. (2005) utilizando la reacción de Antrona (Yemm y Willis, 1954) (Figura 2.11).

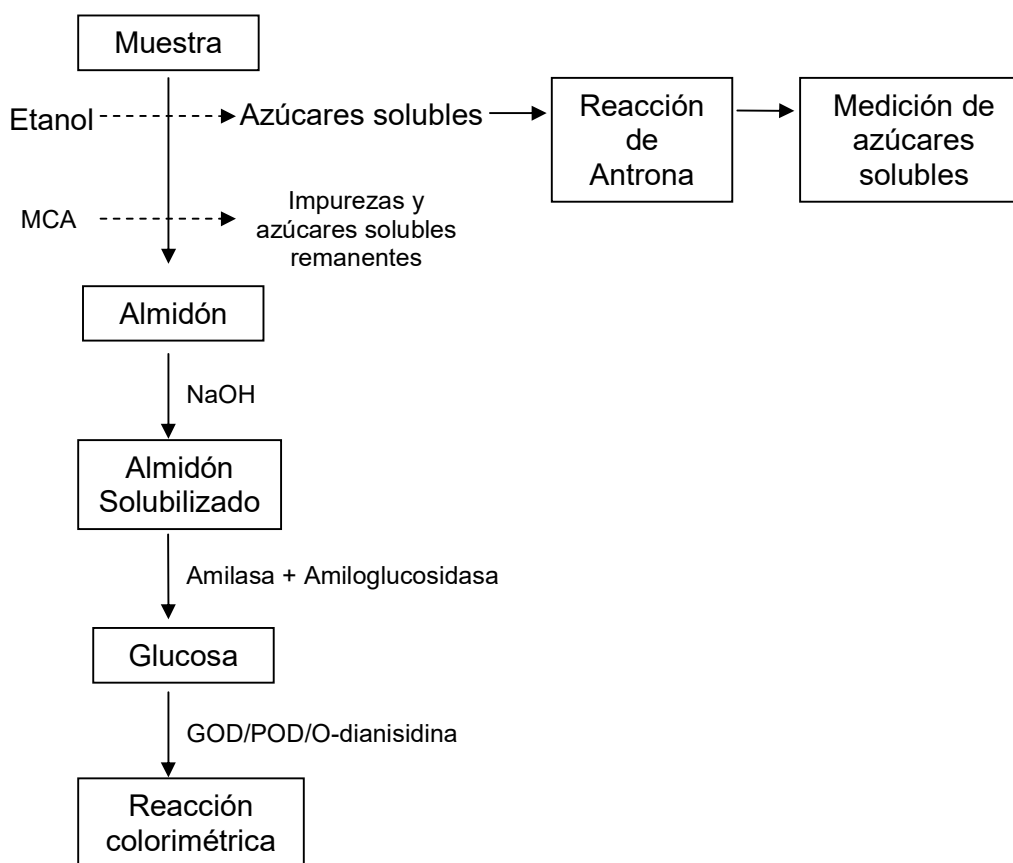


Figura 2.11. Esquema del protocolo de medición de almidón y azúcares solubles. Modificado de Rose et al. 1991.

Para el análisis de azúcares solubles, se homogeneizaron las raíces con N líquido y luego se les añadió etanol 95% (v / v) en una proporción de 1 ml / 250 mg de peso fresco. El extracto se centrifugó a 1500 g por 5 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante; esta operación fue repetida una vez más. El

pellet se recuperó para la determinación de almidón. Los sobrenadantes se combinaron y se centrifugaron a 9000 g durante 5 minutos a 4°C para precipitar cualquier material insoluble restante. Luego se realizó la reacción combinando 0,5 ml de la mezcla de sobrenadante con 1 ml del reactivo de Antrona (0,2 g de Antrona en 100 ml H₂SO₄ concentrado). Las mezclas fueron calentadas durante 10 minutos a 100°C y luego fueron enfriadas en baño de hielo. Una vez enfriadas las reacciones se midió la absorbancia a 620 nm. Se utilizó glucosa como estándar.

Para las mediciones de almidón se agregaron 5 ml de una mezcla de metano/cloroformo/agua 12:5:3 v/v (MCA) al pellet obtenido anteriormente, luego se agitó por algunos segundos y se sonicó por 2 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 1500 g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Este paso fue repetido por lo menos dos veces más o hasta que el sobrenadante estuviese limpio. Luego se evaporó el MCA completamente en una estufa a 50°C durante 4 horas. Pasado este período, se añadieron 4 ml de solución NaOH 0,1 N, se agitó hasta suspender el pellet y se incubó a 50°C durante 30 minutos agitando cada 10 minutos para solubilizar el almidón. A continuación se ajustó la solución a pH 5,1 mediante la adición de 5 ml de solución 0,1 N de ácido acético. De esta manera, se logró una solución de almidón en *buffer* acetato 0,05 M, pH 5,1. Luego se añadió 1,0 ml de solución de enzima conteniendo 2 U/mL de amiloglucosidasa y 400 U/mL de α -amilasa en *buffer* acetato 0,05 M, pH 5,1. Los tubos se sellaron herméticamente con un tapón de goma, se agitaron y se los incubó a 50-55°C durante 24 h. Luego de la digestión enzimática, los tubos se agitaron y se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos. A continuación se tomaron 0,5 ml de muestra y se le

añadió 5 ml de una solución con la siguiente formulación: o-dianisidina 0,16 mM, 5 U /mL de GOD (glucosa oxidasa) 1 U/mL de POD (peroxidasa) en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0. Las muestras con las enzimas se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego los tubos se transfirieron a un baño de agua fría y se le añadió 1 ml de ácido sulfúrico 75% (v/v) a cada tubo para estabilizar el color. Una vez enfriado, los tubos se taparon y se agitaron y se midió la absorbancia a 525 nm. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con soluciones estándar de glucosa para realizar el patrón de concentraciones. La ecuación general utilizada para calcular los miligramos de almidón en una muestra fue:

$$\text{mg de almidón} / \text{mg de muestra} = y_g \cdot d_f \cdot v \cdot h_f / p_f$$

donde y_g es la concentración de glucosa (mg / 100 ml), d_f es el factor de dilución (por ejemplo, 10 para una dilución 1:9), v es el volumen original de extracción de almidón, h_f es el factor de la hidrólisis del almidón (0,9 según Volenec, 1986) y p_f es el peso fresco de la muestra (mg).

2.7 Otras mediciones

2.7.1 Peso seco

Para el cálculo del peso seco el material vegetal fue puesto por al menos 3 días en estufa a 60°C y luego fue pesado. La diferencia entre peso seco y peso fresco fue considerada como el contenido de agua. En el peso de las hojas no fueron considerados los pecíolos, ya que se pesaron junto con el tallo.

2.7.2 Área foliar

El área foliar se midió por medio de la digitalización de los folíolos mediante un scanner. Las imágenes fueron calibradas y el cálculo del área se realizó con el programa Image J (versión 1.46r, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

2.7.3 Mediciones de clorofila

Para las mediciones de clorofila se utilizó un medidor Minolta SPAD 502. Los valores de SPAD son una medida indirecta del contenido de clorofila. Para las muestras de soja se tomaron cuatro mediciones por folíolo (3 folíolos) y se realizó un promedio entre las doce mediciones. Para *Arabidopsis thaliana* se tomó una medición por cada hoja de la roseta y se realizó un promedio, para los valores del tallo floral fueron tomadas mediciones de al menos tres hojas por tallo floral y se realizó un promedio.

2.8 Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos paramétricos para aquellos conjuntos de datos que reunieron las condiciones necesarias. Para esto fueron realizadas pruebas de normalidad (*Skewness Normality of Residuals*, *Kurtosis Normality of Residuals* y *Omnibus Normality of Residuals*) y pruebas de homogeneidad de varianzas (*Test de Levene*) considerando un error del 5%. Luego se procedió a realizar ANOVA (Análisis de la varianza) y el respectivo *test* a posteriori de Tukey-Kramer, *test t-student* y análisis de regresión para los conjuntos de datos cuyos *test* de normalidad y homogeneidad de varianzas no hayan diferido significativamente. Para los conjuntos de datos que no cumplieron con esta condición se llevaron a cabo análisis no paramétricos: *test* de Kruskal-Wallis y el respectivo análisis a posteriori de Dunn con la corrección de Bonferroni y *tests U* de Mann-Whitney.

Los gráficos fueron confeccionados tomando el promedio de los datos y graficando el error estándar como desviación representado como una barra. Para todos los casos los asteriscos (*) y las diferentes letras indicaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Capítulo III

**Variaciones fenológicas
de la actividad radical.**

**Las raíces y la senescencia
monocárpica.**

3.1 Introducción

Existen dificultades a la hora de integrar y relacionar a nivel de la planta entera la variada literatura respecto de la senescencia (Noodén, 1984) debido a una visión generalmente acotada a procesos celulares o moleculares de los trabajos científicos existentes. En relación a esto, no es habitual encontrar antecedentes que vinculen el desarrollo o metabolismo radical con la senescencia (ver Capítulo I - Sección 1.5). Quizás uno de los aspectos que pueden aportar información respecto de este tema es el estudio de la senescencia monocárpica o senescencia de la planta entera.

La validez del concepto de plantas monocárpicas o policárpicas ha sido cuestionado en gran medida por la ocurrencia de formas, sin embargo, la ocurrencia de casos intermedios no invalida estos conceptos (Noodén 1988a). La soja (*Glycine max*) es un típico ejemplo de senescencia monocárpica (un solo ciclo reproductivo en el ciclo vital) donde la planta completa senesce al alcanzar la madurez reproductiva (estadio fenológico R8) (Harper, 1971). En comparación, las plantas policárpicas (varios ciclos reproductivos en la vida del individuo) declinan mucho más lentamente, pueden perdurar un tiempo mucho más prolongado y generalmente invierten menos recursos en reproducción; en algunos casos donde la inversión en reproducción es alta, la longevidad tiende a decrecer (Noodén, 1988b). *Arabidopsis thaliana* es una planta monocárpica que se utiliza como modelo para la investigación debido a que es pequeña, tiene un ciclo corto de vida y un genoma pequeño que está secuenciado (Goldberg, 1998; Noodén y Penney, 2001). Sin embargo, *Arabidopsis thaliana*

parece tener algunas diferencias en el desarrollo que son comunes a otras especies de plantas monocárpicas (Noodén y Penney, 2001).

Según Thomas *et al.* (2000), de manera general, el sistema radical de una planta puede ser considerado como una “planta perenne puesta patas arriba” donde hay equilibrio entre el crecimiento exploratorio y la muerte del tejido. El hecho de que el sistema radical sea completamente heterótrofo podría definirlo, en términos fisiológicos, como un “organismo simbiótico” con otro autótrofo conformado por los tejidos fotosintéticos donde habría cierta independencia entre ambos.

Los eventos que acompañan al deterioro de raíces durante el desarrollo han sido poco estudiados. Sin embargo, parece que las raíces detienen su crecimiento en la fase reproductiva en las plantas anuales y disminuyen la absorción de minerales, como así también la producción y el transporte de hormonas decrecen (Noodén, 1988b). Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* el consumo de N parece disminuir en la fase reproductiva (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). En soja se considera como un hecho que el crecimiento de las raíces declina tempranamente en la fase reproductiva e incluso con la aparición de las primeras flores, y la asimilación radical de minerales disminuye antes que la caída en la fotosíntesis durante las fases finales del desarrollo reproductivo (Noodén, 1988b). Sin embargo, en *Phaseolus vulgaris*, no parece haber una correlación entre la muerte radical y el desarrollo reproductivo (Fisher *et al.*, 2002).

Entre uno y dos tercios de los carbohidratos que se traslocan hacia las raíces son utilizados en la respiración y esta fracción tiende a incrementarse con la edad de las plantas como consecuencia de la menor translocación de

fotoasimilados (Lambers *et al.*, 2000). A esto se agrega que hasta el 52% de los carbohidratos producidos por fotosíntesis por día son respirados en las raíces (dependiendo de la especie) y este porcentaje decrece con la edad de las plantas, entre otros factores (Lambers *et al.*, 2000). En términos generales, los costos totales de mantenimiento parecen ser pequeños en comparación con los de crecimiento y absorción de iones (Lambers *et al.*, 2000).

De los macronutrientes requeridos por las plantas, el nitrógeno es el consumido en mayor abundancia y el que más frecuentemente limita el crecimiento (Crawford y Glass, 1998). El NO_3^- además de ser un nutriente, actúa como una señal involucrada en el crecimiento y genera respuestas en el metabolismo induciendo genes involucrados en los mecanismos de asimilación de este ión (Crawford y Glass, 1998). La absorción y la asimilación de NO_3^- tiene un alto costo energético, lo que implica una parte importante de la respiración de las raíces (v.g. en cebada es de aproximadamente el 23% del catabolismo del carbono de las raíces) (Bloom *et al.*, 1992; Lambers *et al.*, 2000). La absorción de NO_3^- por las raíces requiere energía, proveniente de un gradiente de protones, aún cuando la concentración externa sea del rango milimolar (Crawford y Glass, 1998). Por su parte, la asimilación de NO_3^- por acción de la Nitrato Reductasa (NR) requiere de poder reductor proveniente de la respiración mitocondrial lo que constituye otro gasto además de la absorción (Smirnoff y Stewart, 1985). Tanto las plantas de soja (Smirnoff y Stewart, 1985) como *Arabidopsis thaliana* (Ishibashi *et al.*, 2008) presentan actividad NR en hojas y en raíces.

La redistribución del nitrógeno proveniente de las raíces contribuye entre un 0,4 y 16 % del requerimiento de las semillas durante la reproducción

dependiendo de la especie (People y Dalling, 1988). Sin embargo, en algunos casos la redistribución del nitrógeno es mínima o casi nula (Gordon *et al.*, 2000; Nobuyasu *et al.*, 2003). Las raíces funcionales contienen concentraciones de nitrógeno relativamente bajas, y 25% del N radical corresponde a proteínas solubles (People y Dalling, 1988). Posiblemente el recambio de proteínas constituya uno de los procesos que más contribuyen al mantenimiento de la respiración radical (Lambers *et al.*, 2000). Durante el curso de la senescencia, hay una pérdida gradual de alrededor de la mitad de las proteínas solubles, y la movilización ronda el 20 al 30 % del nitrógeno total de las raíces (People y Dalling, 1988).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, no queda claro de que manera ocurre la declinación en la actividad radical durante el período reproductivo en especies anuales, ni como transcurre el desarrollo radical en relación desarrollo reproductivo, sobre todo, en las etapas finales del desarrollo. En el presente capítulo se presentarán los resultados (cuantificación de biomasa, a la actividad respiratoria de raíces, a la absorción y asimilación de N y a los contenidos de proteína) de los ensayos llevados a cabo con el fin de cumplir con el Objetivo específico 1:

“Caracterizar las alteraciones en el crecimiento y funcionamiento de las raíces en plantas de *Arabidopsis thaliana* a partir de la aparición visible del tallo floral y en los estadios reproductivos de soja (*Glycine max*)”.

3.2 Resultados en *Arabidopsis thaliana*

3.2.1 Estadios del desarrollo reproductivo en *Arabidopsis thaliana*

Se distinguieron 6 estadios del desarrollo teniendo en cuenta el crecimiento y el grado de maduración de los tejidos fotosintéticos (roseta y tallos florales): a las 4, 5, 13, 17, 21 y 26 semanas postsiembra (sps) (Figura 3.1). Cabe aclarar que algunos estadios se superpusieron en el tiempo, en especial, los últimos, encontrándose algunas plantas con tejido verde, otras con parte del tejido correspondiente a los tallos reproductivos en estado de maduración avanzado y plantas totalmente secas con igual cantidad de días postsiembra. De esta manera se hallaron incluso plantas de más de 7 meses postsiembra con gran cantidad de tejidos fotosintéticos aún verdes.

Como las plantas mantenidas permanentemente a días largos tuvieron una escasa biomasa radical en estadios tempranos, y esto podría dificultar algunas mediciones, en ensayos posteriores se cultivaron plantas en fotoperíodo corto (8 horas luz) por 5 semanas con el fin de obtener estadios pre-reproductivos y reproductivos iniciales con mayor biomasa radical y de la roseta (en los ensayos en fotoperíodos largos las plantas florecían muy pequeñas), pasando luego a día largo estas plantas (16 horas luz) para inducir la floración. Estos ensayos duraron más de 9 meses postsiembra, hasta que las plantas alcanzaron un estadio completamente senescente. Por otro lado, en los últimos estadios de desarrollo, el grado de deterioro del tejido radical, dificultó el muestro de mitocondrias por microscopía de fluorescencia.

Aparentemente la generación de tejido reproductivo en *Arabidopsis thaliana* sería en cierta medida indeterminada.

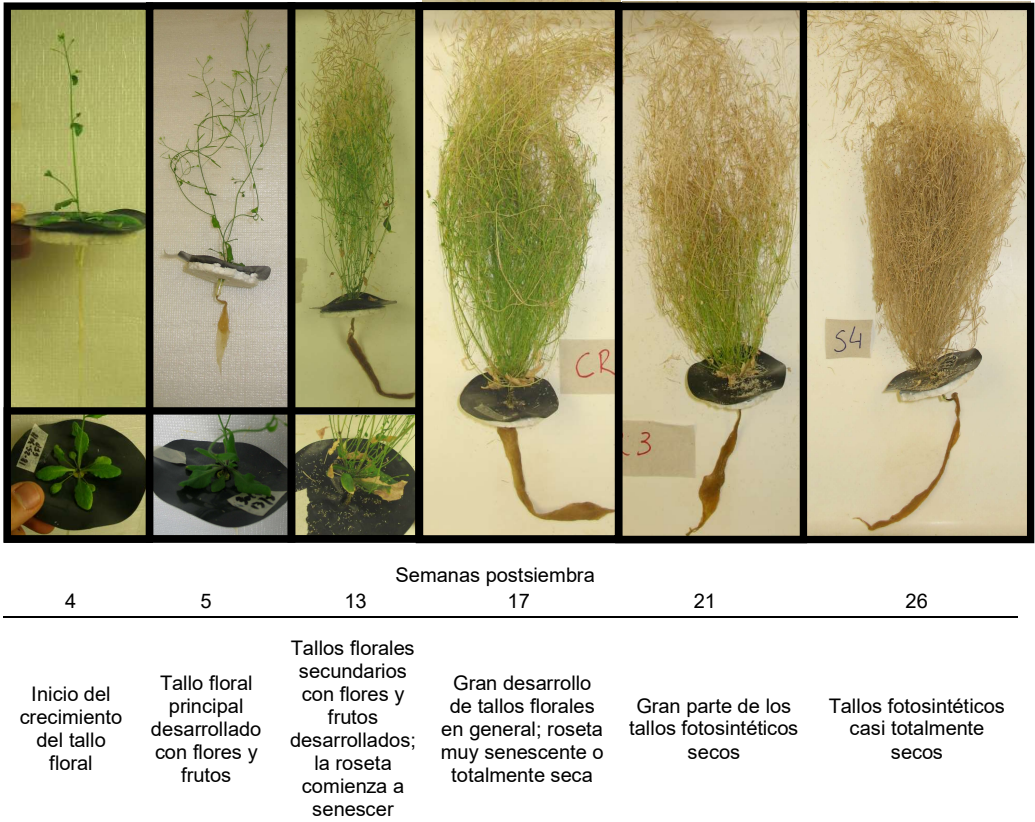


Figura 3.1. Descripción de los estadios del desarrollo en base al desarrollo de los tejidos fotosintéticos y reproductivos en *Arabidopsis thaliana*

3.2.2 Acumulación de Biomasa

La acumulación de biomasa (peso seco, PS) en los tallos florales (sólo se tuvo en cuenta la biomasa verde, lo que explica el valor = 0 a las 26 sps) excedió en un orden de magnitud la biomasa de las raíces y de la roseta, con un máximo a las 17 sps y luego decreciendo hacia las 21 sps (Figura 3.2). Las raíces acumularon biomasa hacia la semana 13 postsiembra y luego esta se mantuvo hasta 21 sps, hacia las 26 sps ocurrió una disminución. Las rosetas acumularon biomasa hacia la semana 5 postsiembra y luego los valores disminuyeron en las 13 sps. El contenido de agua de las raíces se mantuvo constante durante todo el ensayo (datos no mostrados).

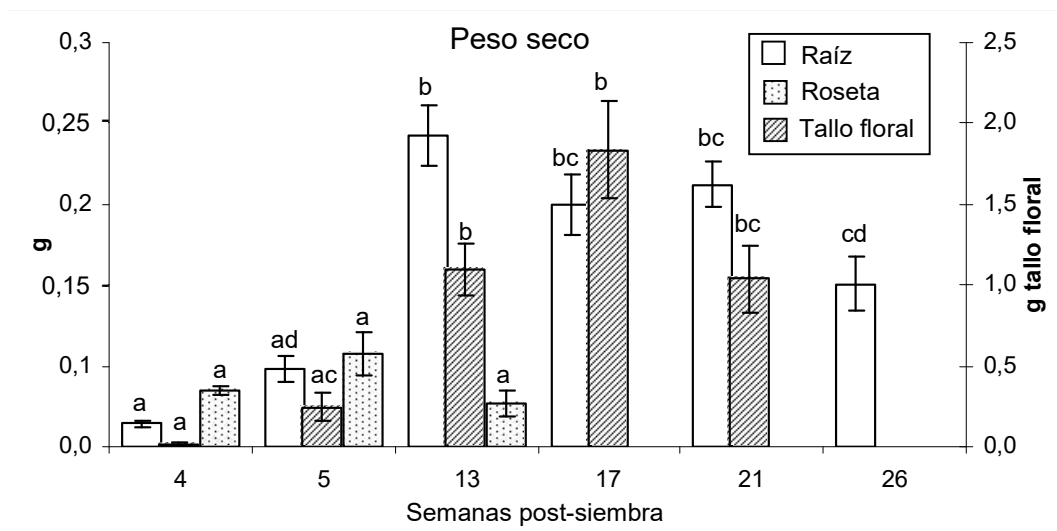


Figura 3.2. Acumulación de biomasa (peso seco) en los estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* correspondiente a 4, 5, 13, 17, 21 y 26 semanas post-siembra (sps). Las distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$) para las distintas fechas de muestreo dentro de cada serie de datos (raíz, roseta y tallo floral). El eje de la derecha corresponde a los valores del tallo floral.

3.2.3 Consumo de O₂

El consumo de O₂ (i.e. respiración) por las raíces, referido al peso fresco (PF), sólo presentó una caída significativa a las 26 sps, mientras que los tejidos fotosintéticos, roseta y tallos florales, comienzan a decrecer con anterioridad (Figura 3.3a). La respiración total por órgano (respiración relativa al peso fresco multiplicada por el PF total del órgano) mostró un patrón parabólico donde la mayor actividad se encontró entre las 13 y 17 sps (Figura 3.3b). Es de destacar la gran actividad respiratoria de los tallos florales principalmente debida a su acumulación de biomasa.

3.2.4 Consumo de NO₃⁻

El consumo (i.e. absorción) de NO₃⁻ por gramo de PF cayó a las 13 sps y volvió a decrecer hacia el final del ciclo de la planta (Figura 3.4a). El consumo total de las raíces, al igual que el consumo de oxígeno por órgano, tuvo una respuesta parabólica con un máximo hacia las 13 sps (Figura 3.4b).

3.2.5 Actividad Nitrato Reductasa (NR)

La actividad NR por gramo de PF (Figura 3.5a) mostró los mayores valores a las 4 y 5 sps en roseta y tallo, en cambio las raíces tuvieron menores actividades pero sostenidas hasta las 21 sps. La actividad NR por órgano (Figura 3.5b) no evidenció un patrón parabólico claro como en los casos del consumo de oxígeno y el consumo de NO₃⁻, pero al igual que estos, los mayores valores se encontraron entre las 13 y 21 sps.

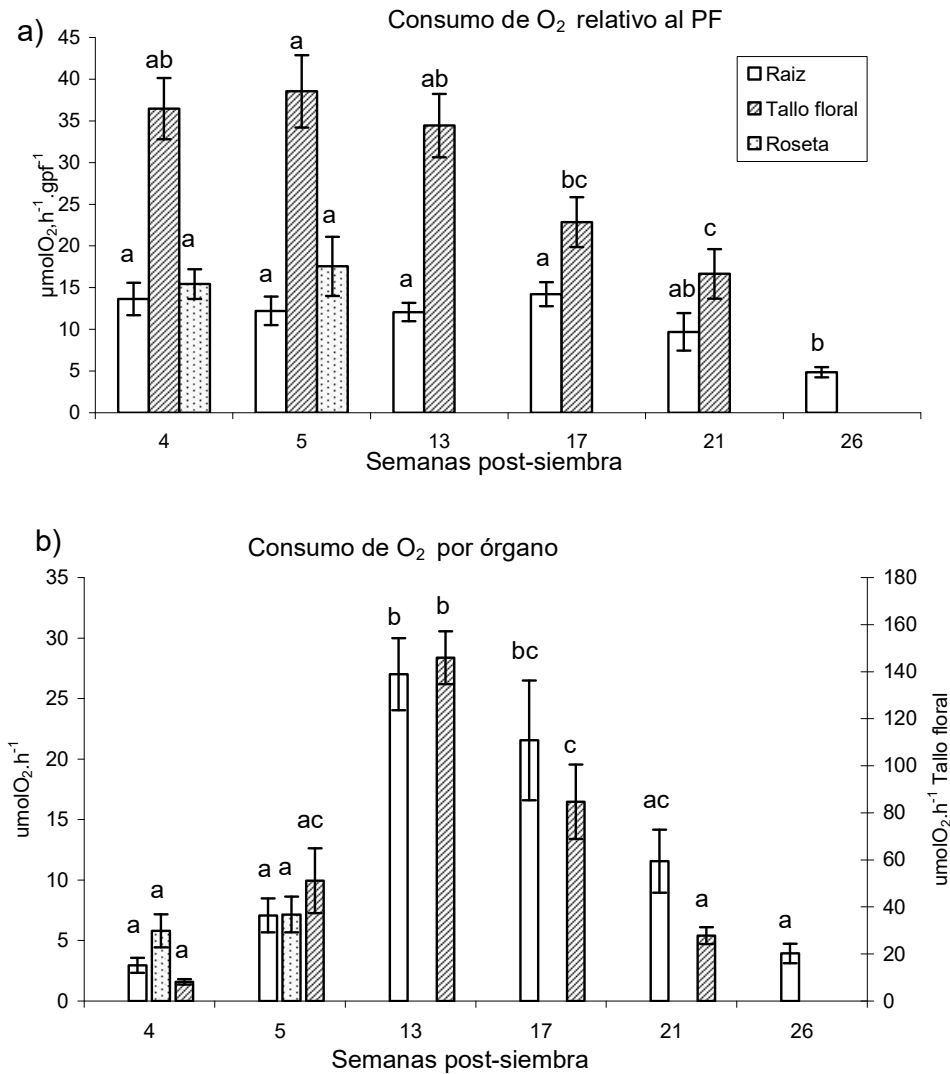


Figura 3.3. Consumo de O₂ en los diferentes estadios de desarrollo en el ensayo con plantas de *Arabidopsis*. a) Consumo de O₂ relativo al peso fresco. b) Consumo de O₂ por órgano calculado como $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gpf}^{-1}$ multiplicado por la biomasa (raíz, tallo floral o roseta); el eje de la derecha corresponde a valores del tallo floral, el eje de la izquierda representa raíces y roseta. Las distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA $P \leq 0,05$) entre las fechas de muestreo dentro de cada serie de datos (raíz, roseta y tallo floral).

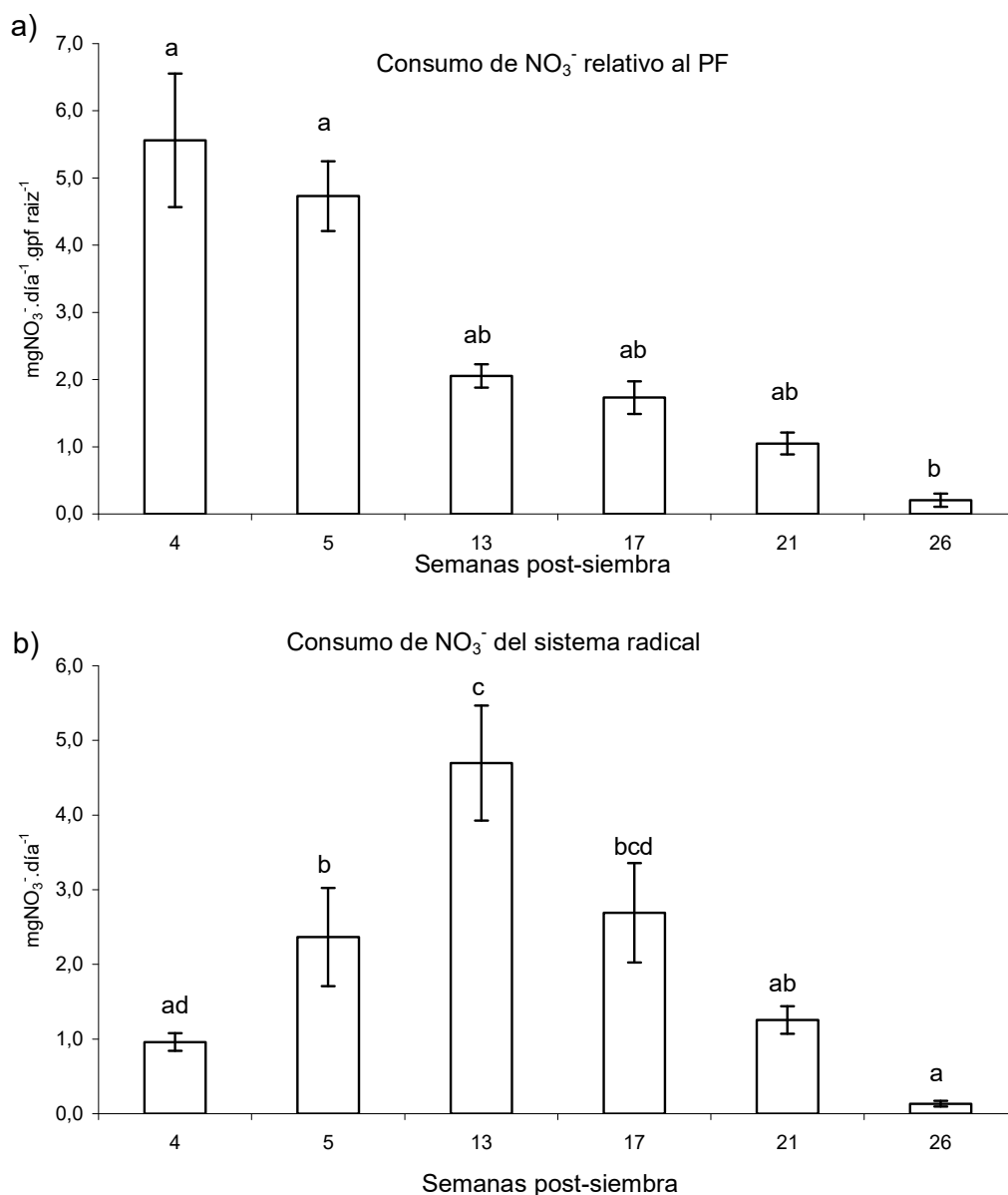


Figura 3.4. Consumo de NO_3^- del ensayo con plantas de *Arabidopsis*. a) Consumo de NO_3^- por gramo de raíz (las diferentes letras corresponden a diferencias significativas $P \leq 0,05$ derivadas del análisis de Kruskal-Wallis). b) Consumo de NO_3^- por planta (las diferentes letras corresponden a diferencias significativas $P \leq 0,05$ derivadas del ANOVA).

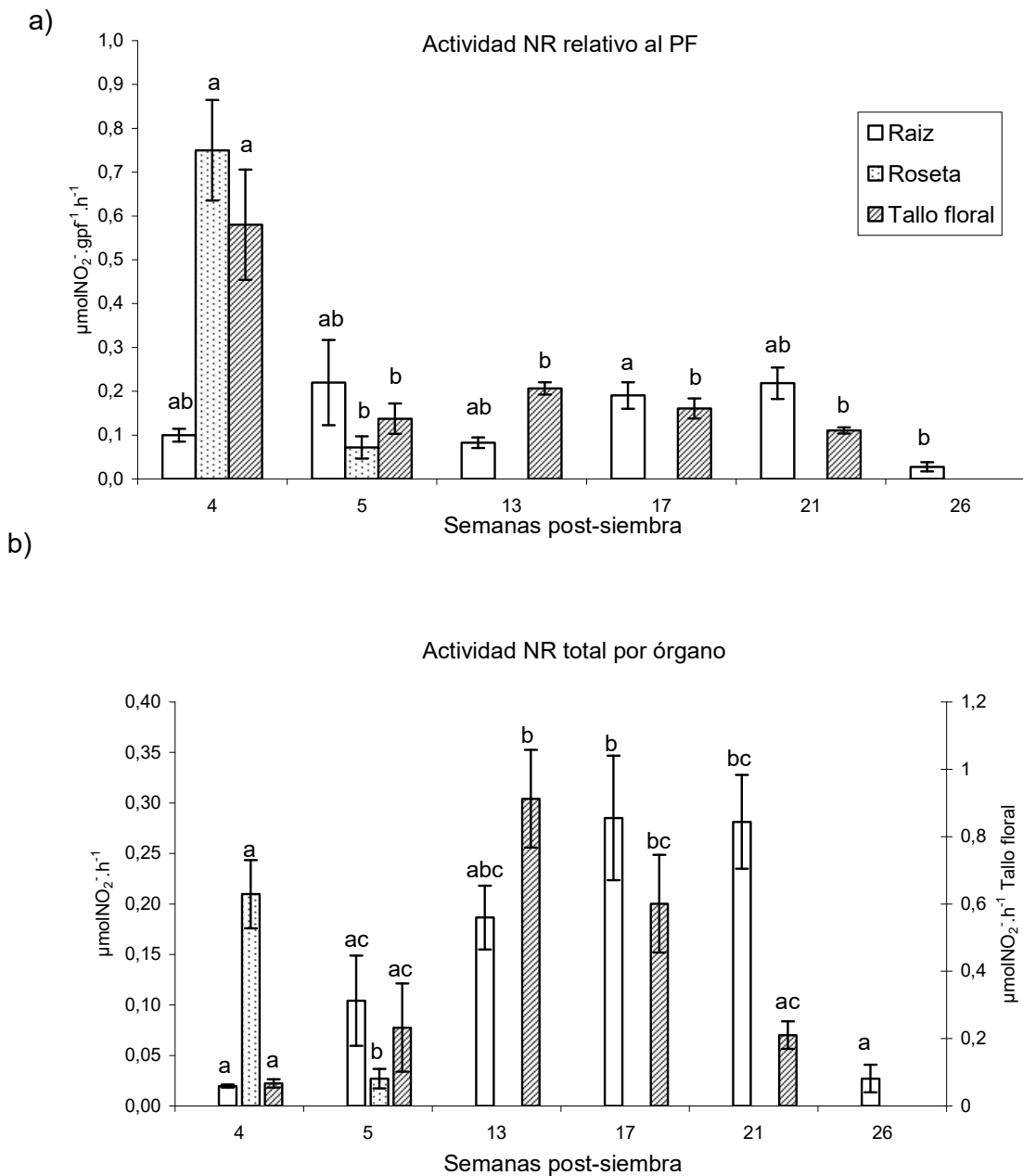


Figura 3.5. Actividad NR en el ensayo con plantas de *Arabidopsis*. a) Actividad NR por gramo de peso fresco. b) Actividad NR total por órgano (raíz, roseta y tallo floral). Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas $P \leq 0,05$ derivadas del ANOVA para las distintas fechas de muestreo dentro de cada serie de datos (raíz, roseta y tallo floral).

3.2.6 Proteínas totales de las raíces

Las cantidades de proteínas totales en las raíces comenzaron a decrecer a las 13 sps y siguieron decreciendo hasta las 21 sps (Figura 3.6). Se pudo calcular una tasa de pérdida de proteína de 3,1% por semana ($R^2 = 0,73$) desde las 4 sps a las 21 sps. Si bien no hubo diferencias significativas entre las 4 sps y 17 sps, sí se pudo observar una tendencia hacia la disminución.

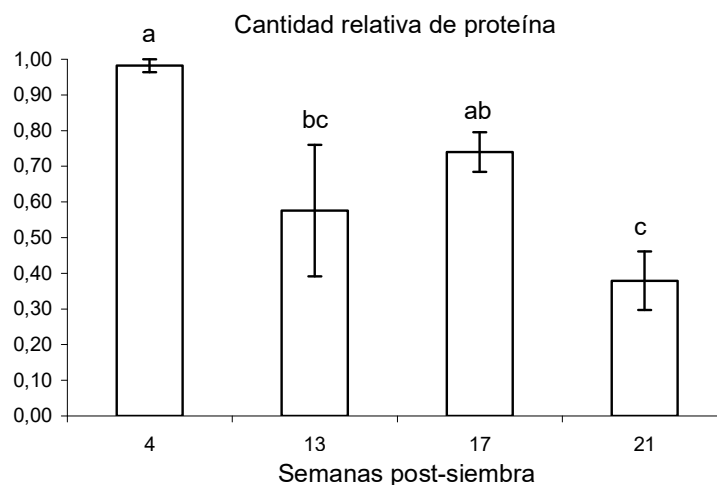


Figura 3.6. Cantidades relativas de proteínas totales de las raíces de *Arabidopsis*. Fueron sembrados el equivalente a 4,5 mg de tejido por calle en geles de poliacrilamida a partir de los cuales se cuantificaron las cantidades relativas de proteínas. Las diferentes letras indican diferencias significativas $P \leq 0,05$ derivadas del ANOVA. Los valores mostrados corresponden a la cantidad de proteína relativa al mayor valor calculado de área de ploteo resultante del análisis de los SDS-PAGE con el programa ImageJ.

3.2.7 Discusión y conclusiones parciales

Variación de la actividad radical durante el desarrollo reproductivo

De los macronutrientes requeridos por las plantas, el nitrógeno es el consumido en mayor abundancia y uno de los que más frecuentemente limita el crecimiento (Crawford *et al.*, 1998). La respiración mitocondrial por su parte, genera la energía necesaria para los procesos de absorción y asimilación de NO_3^- (Smirnoff y Stewart, 1985; Bloom *et al.*, 1992; Crawford *et al.*, 1998), y por lo tanto su determinación es un parámetro importante del funcionamiento de las raíces. La caracterización del desarrollo derivó en 6 estadios distinguidos principalmente por la cantidad de tejido fotosintético presente y la acumulación de biomasa de cada órgano. En todos los parámetros metabólicos medidos (consumo de O_2 , consumo de NO_3^- y actividad NR) la declinación durante el desarrollo de estas actividades expresadas por gramo de peso fresco es compensada por la cantidad de tejido producido, donde la disminución referida al peso fresco (en 13 spp) corresponde a un aumento de la actividad global por órgano (actividad NR y consumo de O_2) o por planta entera (consumo de NO_3^-).

La disminución del contenido de proteínas totales radicales no se corresponde con una disminución de la biomasa, por lo que podría haber procesos de redistribución de componentes proteicos desde la raíz. Al igual que el consumo de NO_3^- , en las proteínas hay una tendencia a la disminución hacia las 13 spp, lo que podría suponer que el contenido de proteína este relacionado sobre todo con las demandas de N por parte del resto de la planta. Es importante resaltar que mientras el tallo floral tiende a disminuir su actividad NR

total, las raíces la mantienen hacia los estadios finales; sin embargo, cuando el tejido fotosintético desaparece, la actividad radical cae. En etapas reproductivas, la eficiencia en la removilización del N parece depender de la relación entre la biomasa de los órganos que funcionan como fuente de recursos y los que lo hacen como destino (Diaz *et al.*, 2008). Parecería que, en términos generales, la actividad radical estaría vinculada sobre todo a las demandas de los tejidos fotosintéticos, pero también parecería haber cierta autonomía hacia el final del ciclo de vida manteniendo las raíces tasas metabólicas activas cuando la parte aérea parece ya haber cesado en su actividad.

Estadios del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*

En estos ensayos se estudió el envejecimiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* y su vinculación con la actividad metabólica radical. En un primer experimento se utilizaron plantas creciendo bajo un fotoperíodo de 16 hs ya que, presumiblemente, con esto se acortarían los tiempos de floración y desarrollo (Haughn *et al.*, 1995). Se determinaron estadios de manera cualitativa teniendo en cuenta la cantidad relativa de tejido aéreo verde (Figura 3.1). En la mayoría de los estudios de senescencia de la planta entera, los contenidos de clorofila han sido usados como medida de senescencia, pero en algunos casos, como en *Arabidopsis thaliana*, la longevidad resulta ser una mejor medida y la muerte de la última hoja de la roseta o del tallo floral parece ser un buen indicador de la muerte de la planta entera (Noodén y Penney, 2001).

La roseta se marchita tempranamente, mientras que las raíces y los tallos florales siguen acumulando biomasa por un tiempo más prolongado. Esta observación sugiere que en *Arabidopsis*, la roseta representa una etapa inicial del desarrollo vegetativo dando lugar luego a un periodo reproductivo caracterizado por la producción indeterminada de tallos florales. Esto sugiere que *Arabidopsis thaliana* sería un caso intermedio entre planta monocárpica y una planta con crecimiento indeterminado, o al menos no presenta los síntomas de senescencia de una planta monocárpica típica. El continuo crecimiento y regeneración es un factor de “perennidad” (Thomas *et al.*, 2000; Noodén y Penney 2001) y *Arabidopsis thaliana* presenta este tipo de características, ya que las estructuras reproductivas portan hojas, es decir tienen una morfología intermedia reproductiva/vegetativa. El control de la senescencia por parte de las estructuras reproductivas es común entre las plantas monocárpicas, pero podría ser que no ocurra en todas, y *Arabidopsis thaliana* puede ser un ejemplo de este último tipo de comportamiento (Noodén y Penney, 2001).

Estos resultados condujeron a realizar ensayos en una especie monocárpica, como la soja (*Glycine max*) cuyos resultados se presentan más adelante en este capítulo. A diferencia de la soja, hay evidencia en contra del control de la senescencia de hojas por las estructuras reproductivas en *Arabidopsis thaliana* (Noodén y Penney, 2001). En muchas especies monocárpicas las estructuras reproductivas controlan la longevidad de las hojas (Noodén, 1988b) pero *Arabidopsis thaliana* muestra una remarcable desconexión entre las estructuras reproductivas y la vida de las hojas individuales (Noodén y Penney, 2001).

Por otro lado, el decaimiento de la actividad respiratoria de las raíces posterior a la muerte de las hojas indicaría que las raíces experimentan un envejecimiento por falta de fotoasimilados. Esto también se vio reflejado en el patrón de consumo de O₂ total por órgano que fue similar en las raíces y en los tejidos fotosintéticos. De acuerdo a estos resultados obtenidos se continuó el trabajo con *Arabidopsis thaliana* en un sistema experimental más adecuado y reproducible donde se indujo la senescencia en oscuridad (Capítulo IV).

3.3 Resultados en Soja









3.3.1 Serie Fenológica y condiciones de crecimiento

Se identificaron los estadios fenológicos descritos por Fehr *et al.* (1971) (Tabla 3.2) para la variedad de soja Williams 82 (grupo de madurez III) desde R3 a R8 y también se realizaron tratamientos de desfrutado (extracción de vainas) en R5 (Figura 3.7). Las fechas de muestreo y los días post siembra (DPS) de las plantas se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3.1. Fechas de muestreo (cosecha) de los estadios fenológicos		
Estadio	Fecha	DPS
R3	17/02	38
R4	27/02	48
R5	28/02	49
R5tardío (R5t)	20/03	69
R6	07/04	87
R7 y desfrutado	23/04	103
R8	20/05	130

La fecha de siembra fue el 10/01 y la fecha de floración ocurrió entre el 10 y el - 14/02. La rápida transición entre R1 y R3 llevó a realizar sólo mediciones en R3. Una particularidad fue que en R8 el tallo se mantuvo verde (cuando normalmente en este estadio están secas) y las raíces no se mostraron de la coloración marrón oscuro típica de raíces muertas (Comas *et al.*, 2000). El tratamiento de desfrutado se inició en R5.

Tabla 3.2. Estadios del desarrollo reproductivo de Soja según Fehr *et al.*, (1971)

R1	Inicio de Floración: Una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal	
R2	Floración completa: Una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas	
R3	Inicio de formación de vainas: Una vaina en uno de los cuatros nudos superiores del tallo principal mide 5 mm. de largo y presenta hojas totalmente desplegadas	
R4	Vainas completamente desarrolladas: Una vaina de 2 cm en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas	
R5	Inicio de formación de semillas: Una vaina, ubicada en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal contiene una semilla de 3 mm de largo.	
R6	Semilla completamente desarrollada: Una vaina en cualquiera de los cuatro nudos superiores del tallo principal contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas.	
R7	Inicio de maduración: Una vaina normal en cualquier nudo del tallo principal ha alcanzado su color de madurez.	
R8	Maduración completa: El 95 % de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez	

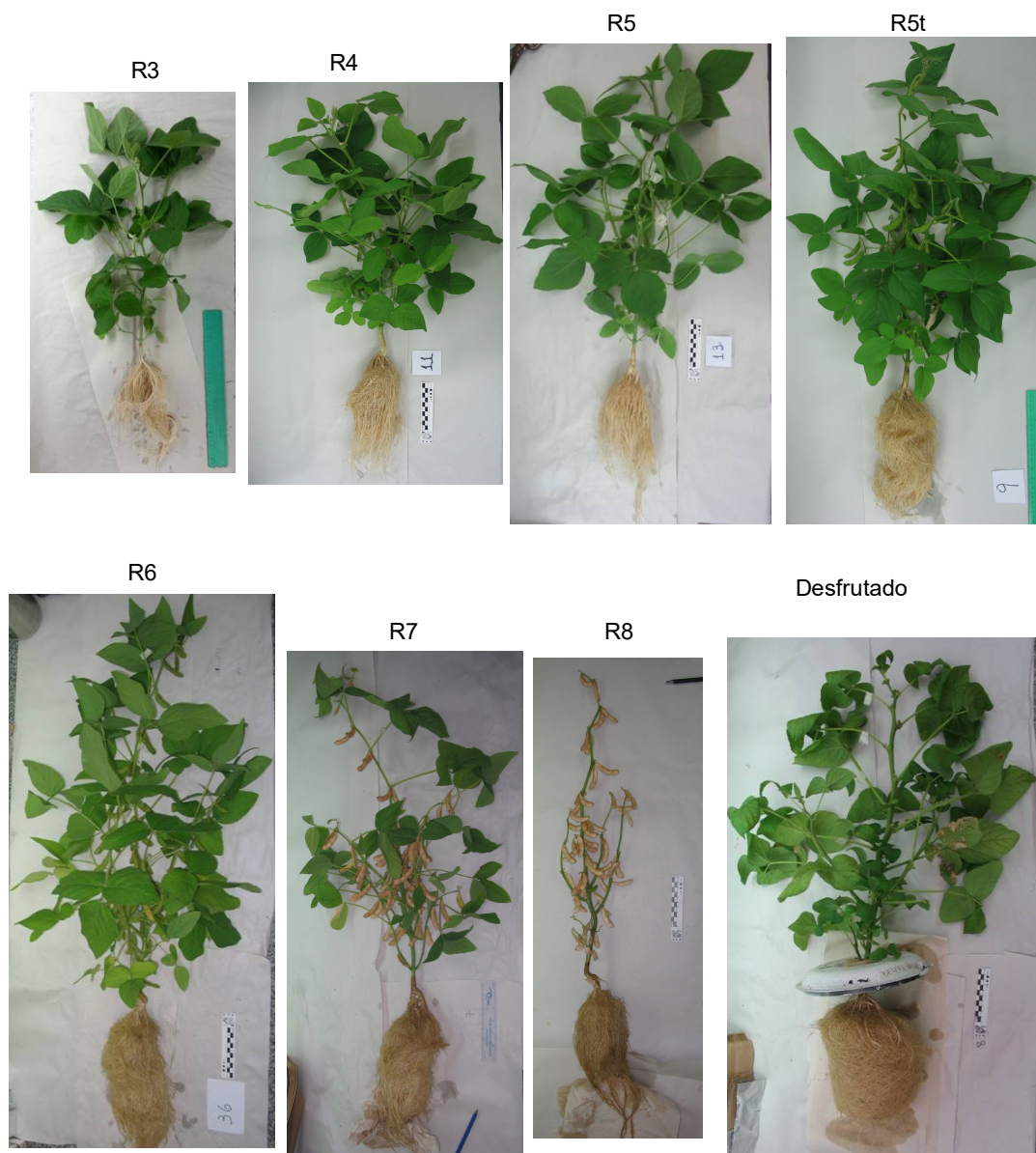


Figura 3.7. Plantas correspondientes a la serie fenológica en soja y al tratamiento de desfrutado, utilizadas en los ensayos. Las fotos corresponden a la misma escala (— = 10 cm)

3.3.2 Cuantificación de clorofila, área foliar y consumo de agua

La cantidad de clorofila se midió en las hojas correspondientes a los nudos impares (partiendo de la primera hoja trifoliolada) del tallo principal (Figura 3.8) de manera indirecta a través de un medidor de SPAD (Figura 3.9a).

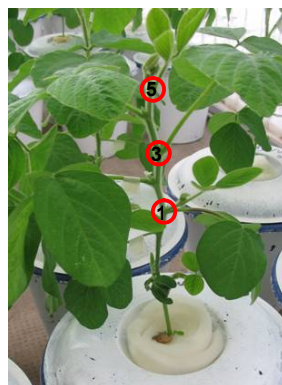


Figura 3.8. Identificación de los entrenudos impares en los cuales se cuantificó la cantidad de clorofila de las hojas correspondientes.

Los valores de SPAD se mantuvieron alrededor de 35 en las hojas 5, 7, 9 y 11 hasta R6. Sin embargo, en R6 hubo una disminución generalizada del contenido de clorofila en todas las hojas. Luego, la caída en R7 se debió principalmente a la abscisión de la mayoría de las hojas, y en R8 finalmente ya no quedaban hojas por lo que los valores se registraron como 0. La pérdida secuencial de clorofila, desde la hoja 1 en R4, a las hojas 3 y 5 en R5t y finalmente de las hojas 7, 9 y 11 en R6 indica una senescencia progresiva desde las hojas basales hacia las apicales del tallo principal. Las plantas desfrutadas no mostraron abscisión de las hojas (excepto la hoja 1, ocurrida en R4) y los valores de SPAD se mantuvieron en valores similares a los de R6. Sin embargo, respecto del estadio inicial (R5) los tratamientos de desfrutado

mostraron una moderada disminución de los valores de SPAD en todas las hojas medidas.

El área foliar total (Figura 3.9b) aumentó hacia R6, donde se alcanzó un máximo, y luego hacia R7 descendió debido a la abscisión de la mayoría de las hojas. Las plantas desfrutadas mantuvieron el área foliar máxima alcanzada en R5t y R6. El consumo de agua (Figura 3.9c) aumentó con el crecimiento del área foliar hasta R5t y luego comenzó a decrecer hasta prácticamente 0 en R8. Las plantas desfrutadas mostraron valores similares a los de R6.

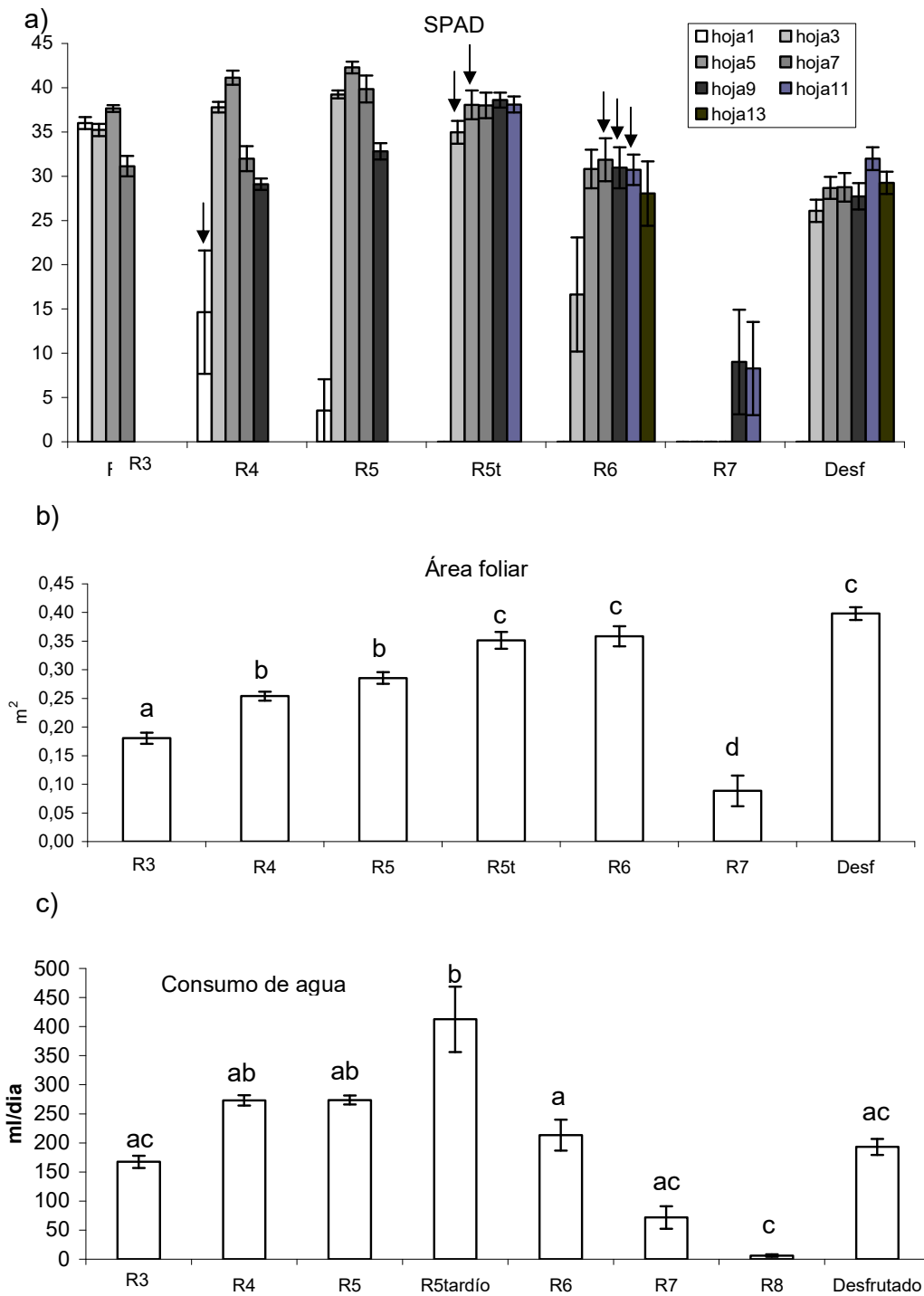


Figura 3.9. Parámetros fisiológicos foliares durante el desarrollo reproductivo en soja. a) Valores de SPAD en las hojas impares de (hoja 1 a hoja 13) en los diferentes estadios del desarrollo (las flechas indican disminuciones significativas, ANOVA $P \leq 0,05$, respecto del estadio anterior). b) Área foliar total en los estadios de desarrollo (las diferentes letras corresponden a diferencias significativas, $P \leq 0,05$, derivadas de ANOVA). c) Consumo de agua correspondiente al periodo de 3 días previos a la cosecha de cada estadio (Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas, $P \leq 0,05$, derivadas del análisis de Kruskal-Wallis)

3.3.3 Partición de la biomasa entre los órganos vegetativos y reproductivos

Las plantas mostraron un aumento de peso seco hasta R5t y R6 en todos los órganos (Figura 3.10). Las hojas en su conjunto mostraron un aumento del peso seco hasta R5t y R6, y una disminución en R7 y R8 principalmente debido a la abscisión foliar. Tanto el tallo como las raíces mostraron un patrón similar de acumulación de biomasa en donde hubo un aumento desde R3 a R5t. Luego los valores en R5t se mantuvieron constantes sin observarse caídas significativas hasta R8. Las plantas desfrutadas incrementaron significativamente la biomasa vegetativa (hojas, tallos y raíces). Comparando con R5 (estadio en el cual se iniciaron los tratamientos de desfrutado) en las plantas desfrutadas las raíces aumentaron su biomasa en 4,7 veces mientras que las hojas y el tallo 3,7 y 3,5 veces, respectivamente.

Los órganos reproductivos (vainas y semillas) mostraron un aumento significativo del peso seco a partir de R5 y R5t. Pudo observarse que, mientras que las vainas acumularon biomasa hacia R5t, las semillas lo hicieron hacia R6 que corresponde con el período final del desarrollo de semillas. Cabe aclarar que tanto las semillas como las vainas se pesaron por separado (el peso calculado de las vainas fue sin semillas) y que el número de vainas a partir de R5t se mantuvo constante (entre 65 y 70 vainas por planta), y el número de semillas se mantuvo constante a partir de R6 (entre 148 y 160 por planta).

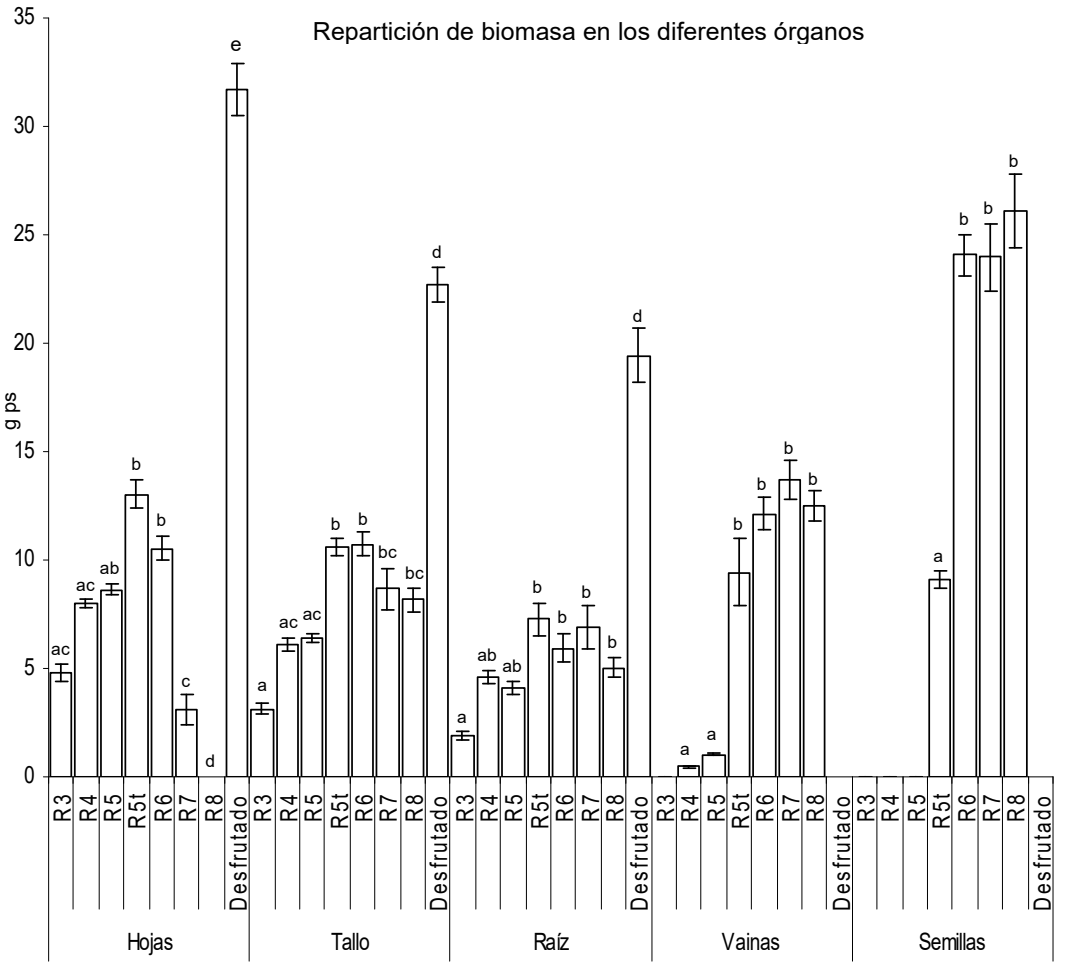


Figura 3.10. Repartición de biomasa (peso seco) en los diferentes órganos vegetativos y reproductivos de los distintos estadios del desarrollo y los tratamientos de desfrutado . Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas entre los distintos estadios de desarrollo dentro de cada grupo de datos (hojas, tallo, raíz, vainas y semillas) ($P \leq 0,05$) derivadas del análisis de Kruskal-Wallis.

3.3.4 Consumo de O₂

La respiración radical por gramo de peso fresco se redujo de manera continua desde R3, pero comenzó a disminuir de manera significativa en R6 y esta disminución se acentuó hacia R8 (Figura 3.11a). La tendencia a la disminución permitió calcular una tasa de caída de $0,31 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gpf}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ($R^2 = 0,78$) entre R3 y R7. Las plantas desfrutadas mostraron una disminución leve de la tasa respiratoria. El consumo de O₂ del sistema radical completo mostró un patrón parabólico con un máximo en R5t (Figura 3.11b). En las plantas desfrutadas se midió un incremento notorio respecto de los estadios estudiados, en gran parte debido a la gran acumulación de biomasa radical.

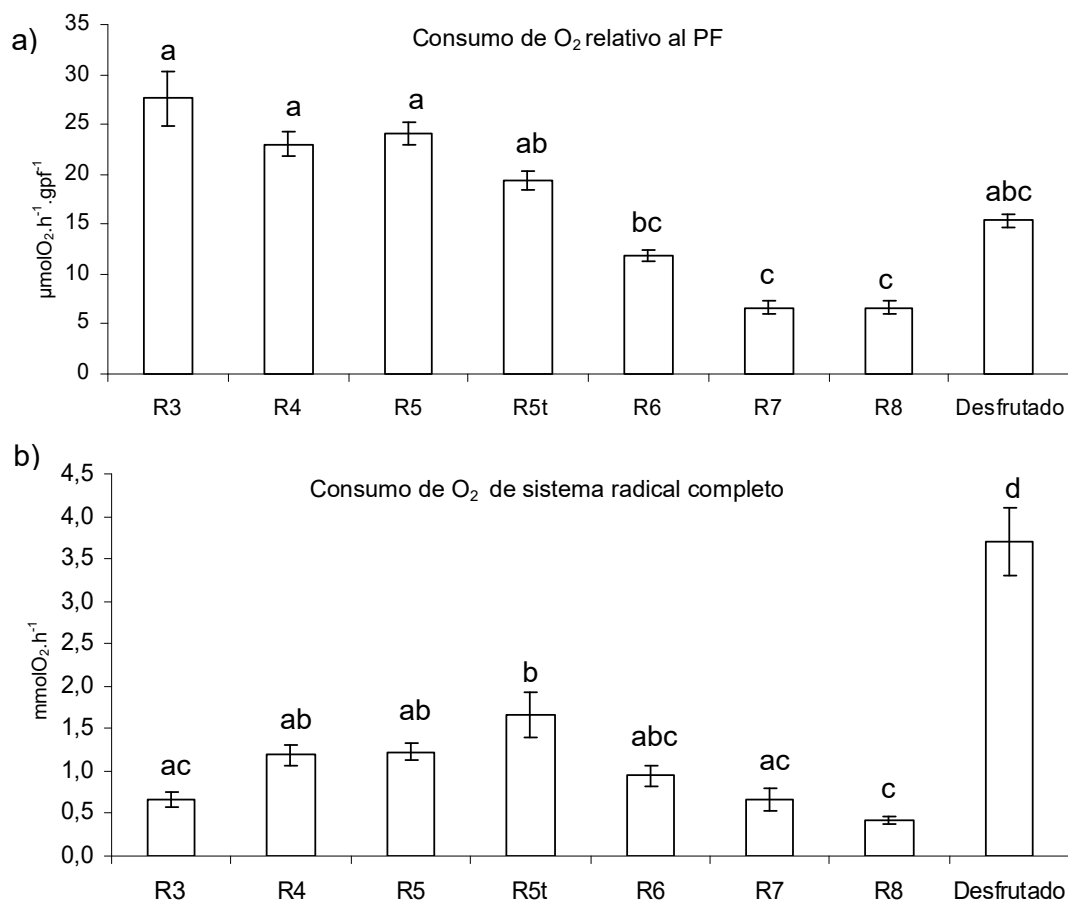


Figura 3.11. Consumo de O₂ radical en los estadios de desarrollo y en el tratamiento de desfrutado. a) Consumo de O₂ relativo al peso fresco. b) Consumo de O₂ del sistema radical completo. Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas $P \leq 0,05$ derivadas del análisis de Kruskal-Wallis.

3.3.5 Consumo de NO_3^-

El consumo de NO_3^- relativo al peso fresco radical decayó de manera gradual hacia R8 a una tasa de $79,5 \mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{gpf}^{-1} \cdot \text{día}^{-2}$ ($R^2=0,60$) (Figura 3.12a). La caída más notoria se encontró en R7 y en R8 donde no fue posible detectar variaciones en las concentraciones de NO_3^- (i.e., absorción) en la solución nutritiva en los tiempos establecidos (3 días, ver capítulo 2 “Consumo de nitratos”). Los tratamientos de desfrutado mostraron valores similares a los de las plantas intactas en R6. El consumo de NO_3^- relativo al sistema radical completo evidenció valores sin diferencias significativas entre R4 y R6, pero hacia R7 y R8 los valores fueron significativamente menores (Figura 3.12b). Las plantas desfrutadas mostraron valores elevados de este parámetro en comparación a la serie fenológica, aunque las diferencias no fueron significativas respecto de la mayoría de los estadios de desarrollo.

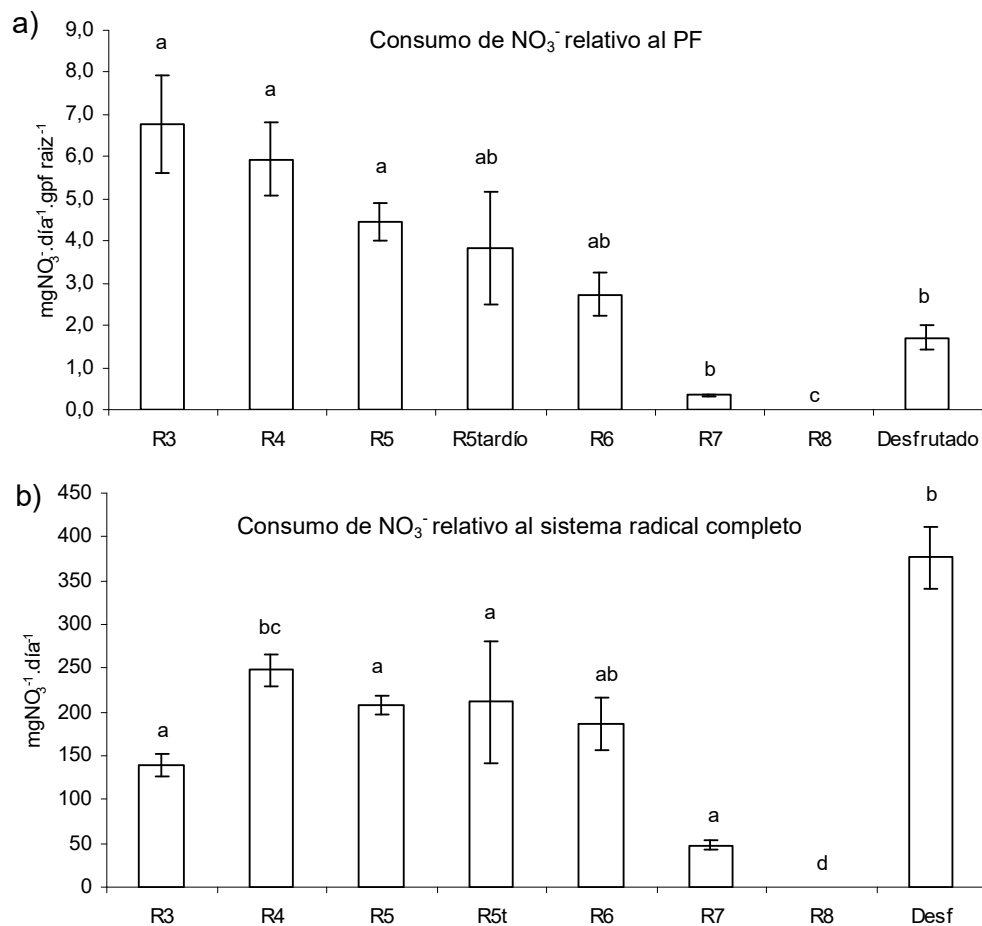


Figura 3.12. Consumo de NO_3^- del ensayo en soja. a) Consumo de NO_3^- relativo al peso fresco (PF). b) Consumo de NO_3^- del sistema radical completo (consumo de NO_3^- relativo al PF multiplicado por el PF). Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas ($P \leq 0,05$) derivadas del análisis de Kruskal-Wallis.

3.3.6 Actividad Nitrato Reductasa (NR)

La actividad de NR cayó de manera significativa hacia R7-R8, sin embargo las medias mostraron una tendencia a una declinación gradual, aunque con marcadas oscilaciones entre estadíos sucesivos (Figura 3.13a). Los tratamientos de desfrutado mostraron valores similares a los de las plantas intactas en R4-R6. A nivel de planta entera la actividad NR solamente decayó en R8 de manera notoria, aunque no se pudieron detectar diferencias significativas entre la mayoría de los estadíos (Figura 3.13b). Las plantas desfrutadas demostraron una actividad incrementada respecto a los estadios R3-R7, si bien la magnitud del error estadístico no permitió diferenciarlos significativamente, excepto con R8.

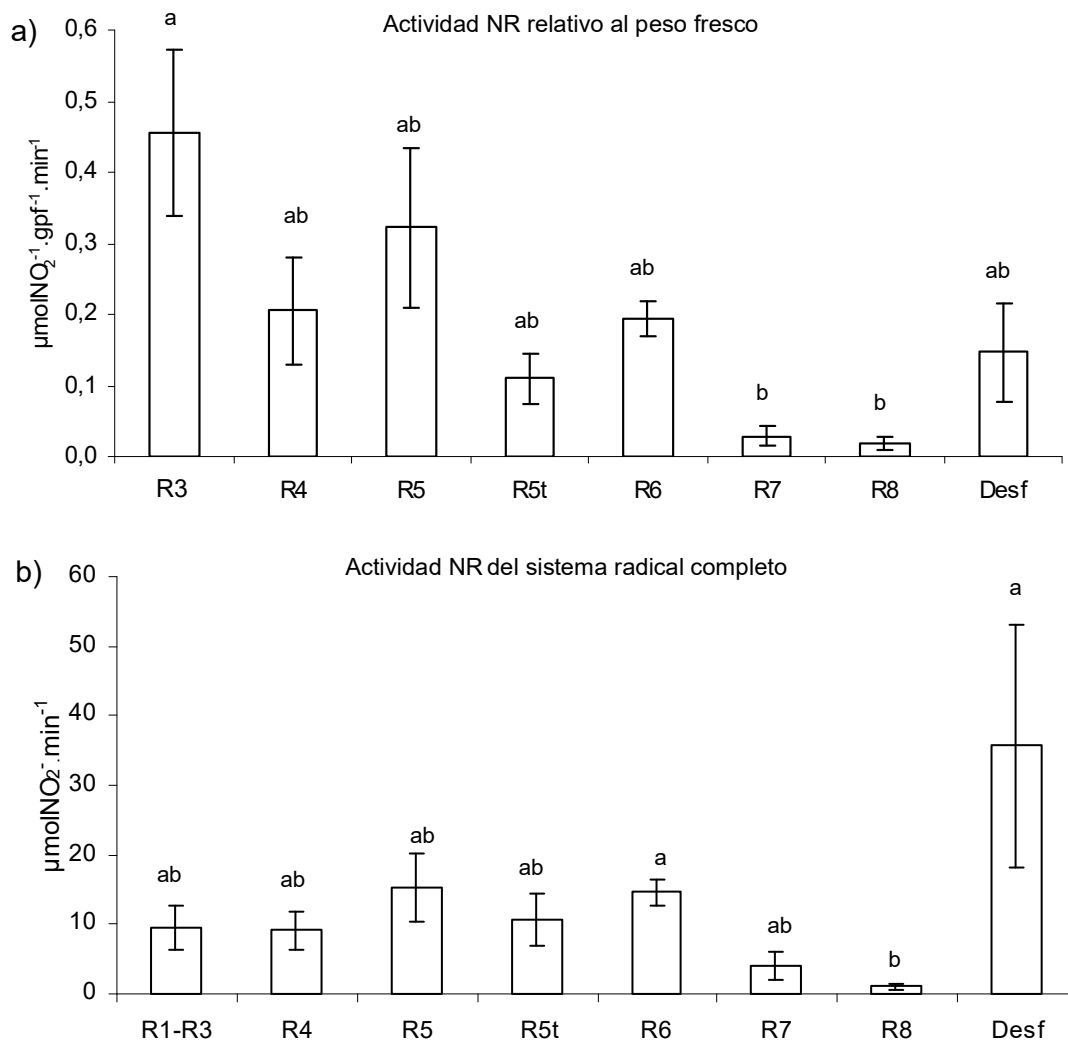


Figura 3.13. Actividad NR (nitrato reductasa) estimada por la producción *in vivo* de NO_2^- . a) Actividad NR relativo al PF (peso fresco). b) Actividad NR del sistema radical completo (Actividad NR relativo al PF multiplicado por el PF). Las diferentes letras corresponden a diferencias significativas ($P \leq 0,05$) derivadas del análisis de Kruskal-Wallis.

3.3.7 Proteínas radicales totales y mitocondriales

La cantidad de proteínas totales disminuyó entre R5 y R6 y luego se mantuvo constante hasta R8 (Figura 3.14a). Se pudo calcular una tasa de pérdida de proteína de 4,2% por semana ($R^2 = 0,75$) desde R3 a R8. En R8 se pudo cuantificar una retención de alrededor del 44,3% de la proteína total en R3-R5. El tratamiento de desfrutado mostró valores intermedios a los de las plantas intactas en R3 y R6, solo diferenciándose significativamente de R3 y R5. La caída en las plantas desfrutadas representó un 26,5% respecto de R5 (estadio en el cual se iniciaron los tratamientos).

La proteína mitocondrial COX2 (proteína del complejo de la citocromo c oxidasa) disminuyó de manera significativa hacia R6 y no pudo detectarse en R8. La oxidasa alternativa (AOX) sólo pudo detectarse en R3 y en las plantas desfrutadas, donde en estas últimas se obtuvieron los mayores valores (Figura 3.14b).

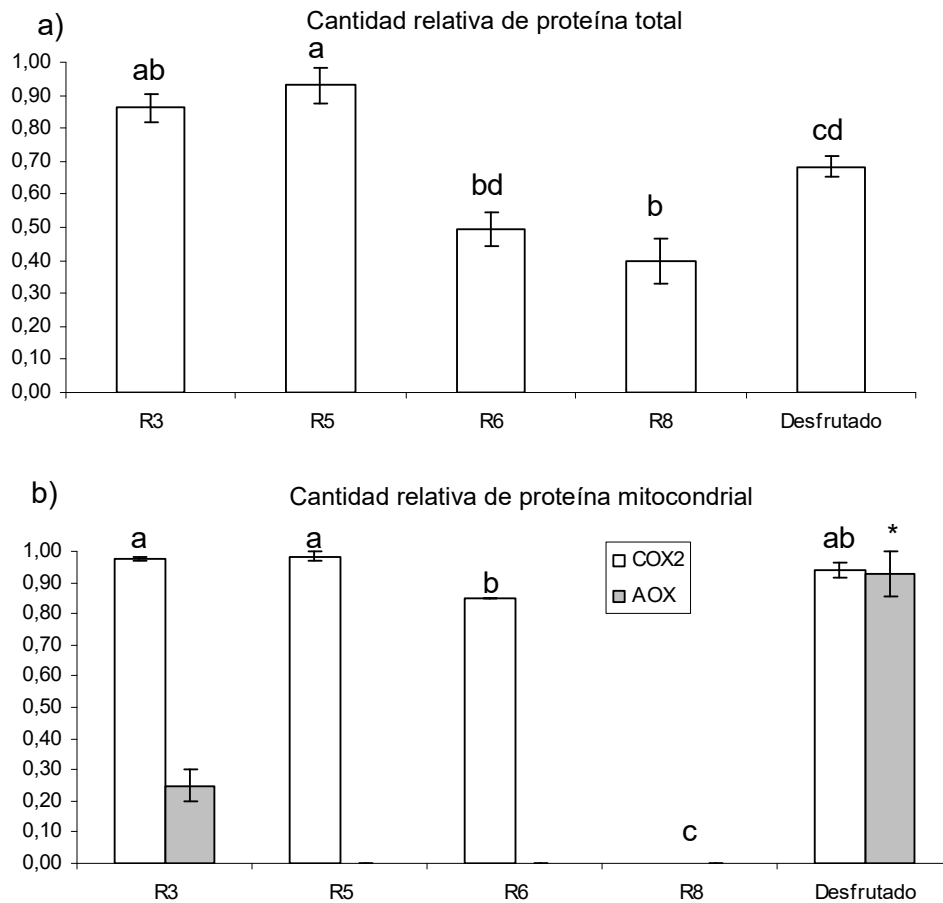


Figura 3.14. Cantidades relativas de proteínas del ensayo en soja. a) Proteínas totales. b) Proteínas mitocondriales: AOX (oxidasa alternativa) y COX2 (proteína del complejo IV mitocondrial) que fueron obtenidas por Western blot. Fueron sembrados el equivalente a 2 mg de tejido por calle. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) derivadas del ANOVA. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto de R3. Los valores mostrados corresponden a la cantidad de proteína relativa al mayor valor calculado de área de ploteo resultante del análisis de los SDS-PAGE y Western blots con el programa ImageJ.

3.3.8 Discusión

Los estadios del desarrollo reproductivo en soja pudieron caracterizarse por la cantidad de tejido fotosintético, la acumulación de biomasa de cada órgano y por la actividad metabólica radical. Al igual que en *Arabidopsis thaliana*, los parámetros metabólicos medidos (consumo de O₂, consumo de NO₃⁻ y actividad NR) parecen mostrar una compensación entre la actividad metabólica específica (i.e., por gramo de peso fresco) y la cantidad de tejido. En todos estos parámetros se observa un patrón de decaimiento gradual del metabolismo específico (referido al peso fresco) durante el desarrollo y un patrón parabólico de la actividad total. De forma general, la actividad metabólica se mantiene en los estadios intermedios y disminuye hacia el final del desarrollo.

Los datos obtenidos parecen indicar que los patrones de acumulación de biomasa, el patrón radical de metabolismo respiratorio y el contenido de proteínas durante el desarrollo reproductivo, y la prolongación de la actividad radical mas allá de los estadios de senescencia avanzada de la parte aérea, son similares en especies cuyos tiempos y forma de maduración son distintos, como *Arabidopsis thaliana* y soja. El hecho de que una planta monocárpica con ciclo bien determinado como la soja y una planta con una mayor superposición del crecimiento reproductivo y vegetativo, con un ciclo parcialmente indeterminado como *Arabidopsis thaliana* coincidan en estos aspectos podría indicar que las raíces no están sometidas a un programa de senescencia como los tejidos fotosintéticos, sino más bien a las demandas de éstos. En este sentido, Fisher *et al.* (2002) llegaron a conclusiones similares en plantas de poroto, donde en condiciones no limitantes de recursos una porción substancial

de las raíces siguieron vivas pasando la madurez reproductiva y comenzaron a morir luego de que la parte aérea había sufrido la abscisión de las hojas y el secado de las vainas.

Parecería que las raíces una vez que dejan de recibir fotoasimilados de los tejidos fotosintéticos incluso sobrevivirían un tiempo con las reservas existentes (ver Capítulo IV). Esto podría explicar las tasas respiratorias todavía significativas en estadios de desarrollo avanzados y la retención de proteínas en las raíces.

R6 como punto de inflexión en soja

El estadio R6 corresponde a la etapa de finalización del crecimiento de las semillas. Este parece ser un período clave para el metabolismo radical, siendo el punto de inflexión en que comienzan a disminuir el metabolismo (a excepción de la actividad NR, que declina más tardíamente). En R6 se llega al peso seco final de los granos, es decir, en su mayoría no acumulan más biomasa. Esta es también la etapa donde hay una disminución generalizada del contenido de clorofila de las hojas del tallo principal y se comienza a observar una caída del peso seco foliar. Es sabido que además de estos parámetros, las tasas fotosintéticas también disminuyen de manera notoria (Noodén, 1988b). Esto también podría explicar en parte la disminución del consumo de agua, debida posiblemente a una disminución de la conductancia estomática asociada a la caída de la fotosíntesis, y a que por otro lado las temperaturas medias y máximas se redujeron hacia R6 (ver Figura 2.2). Las proteínas totales de las raíces, y en menor medida COX2 también disminuyen, lo que implicaría

procesos de degradación y redistribución. Hay que remarcar que si bien las proteínas totales decayeron un 46,8% en R6 respecto de R5, la proteína mitocondrial COX2 solo lo hizo un 13,7%. Esta conservación de proteína mitocondrial podría indicar que los componentes mitocondriales podrían retenerse más que otros componentes celulares en tejidos radicales.

En resumen, estos datos parecen indicar que la actividad radical esta supeditada a las demandas de los tejidos fotosintéticos y reproductivos hasta la etapa de finalización del crecimiento de los frutos (R6) donde comienza la senescencia de la planta entera. Sin embargo, pasada esta etapa, parecería que las raíces se comportan como órganos heterótrofos relativamente independientes. Las raíces sufren procesos de degradación y disminución del metabolismo siguiendo los tiempos de la senescencia foliar (Noodén, 1988b), pero los procesos que podrían desencadenar la senescencia tardía en raíces (v.g., hambreado de compuestos carbonados) parecerían ser diferentes de los que ocurren en los tejidos aéreos.

Plantas desfrutadas

Si a las plantas de soja se les impide el desarrollo de órganos reproductivos (v.g. a través de la extracción de frutos o flores), la senescencia se demora de manera indeterminada (Leopold *et al.*, 1959; Mondal *et al.*, 1978; Wittenbach, 1982; Crafts-Brandner *et al.*, 1984; Noodén y Guamet, 1989). Esto muestra que la “señal de senescencia” depende de la presencia de las estructuras reproductivas (Noodén, 1988b). Es sabido que hay un aumento en

la biomasa foliar en las plantas desfrutadas (Noodén, 1988b) pero es poco conocido qué sucede en las raíces en esta situación.

Al remover los frutos, las raíces incrementaron notablemente la biomasa respecto de los estadios iniciales (R5), al igual que las hojas y el tallo. Sin embargo, este incremento es más notorio en las raíces que en el resto de los órganos (4,7 veces en las raíces, 3,7 en tallos y 3,5 en hojas). En el metabolismo del sistema radical completo, no parece haber una compensación como ocurre en la serie fenológica. Los datos aquí presentados muestran que el aumento de la biomasa es de una magnitud largamente mayor que el cambio del metabolismo, y consecuentemente la actividad del sistema radical en su conjunto incrementó aproximadamente 3 veces el consumo de O_2 y casi 2 veces el consumo de NO_3^- respecto de su estado inicial (R5). Esto no ocurre en las hojas, donde es sabido que la tasa fotosintética declina con el desfrutado (Mondal et al., 1978; Herold et al., 1980; Noodén, 1988b).

La disminución de la cantidad de proteína total en las raíces de plantas desfrutadas (comparadas con plantas intactas en R5) podría deberse a reajustes del metabolismo (que puede verse en la disminución específica del metabolismo) o también al funcionamiento de las proteínas como sustrato respiratorio. El mantenimiento del contenido de la proteína mitocondrial COX2, sugiere que los sistemas de transporte electrónico responsables de la provisión de energía no se ven afectados.

La cantidad de AOX observada en las raíces de las plantas desfrutadas podría indicar que, junto con los sistemas de transporte electrónico, también se estaría estimulando la oxidasa alternativa. Numerosas condiciones ambientales (v.g. anoxia, deficiencias de nutrientes, sequía) y del desarrollo (v.g. floración,

desarrollo de frutos) involucran cambios en las cantidades de AOX (ya sea como ARNm o proteína), en su estado redox o en la actividad respiratoria resistente al CN^- (Juszczuk y Rychter, 2003; Bartoli et al., 2005). La proteína AOX se ha detectado en una gran variedad de especies y tejidos, incluidas las raíces (Considine et al., 2002), como por ejemplo, las raíces de soja (Finnegan et al., 1997; Millard et al., 1997; Ribas-Carbo et al., 1997; Lambers, 2000; Considine et al., 2002; Juszczuk y Rychter, 2003; Finnegan et al., 2004). Sin embargo, poco se sabe de lo que ocurre durante el desarrollo reproductivo o el envejecimiento. En raíces de plántulas de soja, la cantidad de AOX aumenta con la edad pero no así las vías de respiración alternativa (Day et al., 1994) y en tubérculos de papa se ha observado que la AOX se sintetiza *de novo* durante el envejecimiento (Hiser y McIntosh, 1990). Existe evidencia indicando que la inducción de la AOX podría prevenir algunos eventos que desencadenarían la muerte celular (Vanlerberghe et al., 2002).

Los resultados muestran que el desfrutado y el mantenimiento del área foliar podrían estar generando un exceso de fotoasimilados. Una parte de estos fotoasimilados se repartiría hacia las raíces y se acumularía como biomasa, y otra parte sería utilizada como sustrato respiratorio. En estas condiciones la oferta de fotoasimilados superaría a la demanda capaz de canalizarse por la vía del citocromo c y la AOX quizás funcione como un disipador de poder reductor. Una de las formas de disipar energía directamente de los compuestos reducidos es a través de la AOX (Finnegan et al., 2004). Por otro lado, también podría estar implicado algún tipo de estrés, como por ejemplo, una deficiencia moderada y temporaria de NO_3^- (Escobar et al., 2006) o la generación de especies reactivas del oxígeno (Finnegan et al., 2004) en el aumento de las

vías de oxidación alternativas. Es importante destacar que el tamaño de las macetas podría haber sido limitante para el crecimiento de las raíces de plantas desfrutadas y consecuentemente en el metabolismo del C y del N. Los datos obtenidos en este trabajo son indicativos del rol de la AOX en las raíces de soja y serán necesarios futuros estudios para dilucidar su participación en diversos mecanismos fisiológicos (ver Capítulo V).

Las raíces como destino y fuente de recursos

De la misma manera que la defoliación parcial o la atenuación de la radiación solar representarían una disminución en la fuente de fotoasimilados (Borras et al., 2004; Quijano y Morandi, 2011), la remoción de los frutos produciría una disminución en el destino de los fotoasimilados (Noodén, 1984; Nobuyasu et al., 2003). Las raíces parecen ser el destino más fuerte de fotoasimilados cuando no están presentes los frutos (4,7 veces). Durante el desarrollo reproductivo en plantas controles hubo un aumento de la biomasa radical que coincidió con el período de crecimiento de las semillas (período entre R5 y R6). Este aumento en la biomasa radical representa cerca del 9% de peso seco de los granos en R8. A esto se agrega el hecho de que cerca del 56% de la proteína radical parece retenerse en R8 comparado con R3-R5. Esto podría indicar que, sumado al hecho de que las raíces son un destino importante, a madurez habría una retención importante de fotoasimilados en las raíces.

Hasta el momento, los antecedentes encontrados en la bibliografía, indican que el crecimiento de las raíces declina tempranamente en la fase

reproductiva e incluso con la aparición de las flores (Noodén, 1988b). Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo para ambas *Arabidopsis* y soja, parecen indicar lo contrario.

Resultados obtenidos por Nobuyasu et al. (2003) muestran que gran parte del nitrógeno absorbido en plantas desfrutadas se retiene en las raíces. Gordon et al. (2000) mostraron que a nivel ecosistémico la concentración de nitrógeno en las raíces finas vivas y muertas parece ser idéntica, lo que implicaría una retranslocación muy pequeña de nitrógeno desde las raíces hacia el resto de la planta. Esto se repite en varios ecosistemas diferentes y en distintos climas (Gordon et al. 2000). Por otro lado, durante el curso de la senescencia, hay una pérdida gradual de alrededor de la mitad de las proteínas solubles, y la movilización ronda del 20 al 30 % del nitrógeno total de las raíces (Peoples et al., 1983; Peoples y Dalling, 1988). Esta información coincide con los datos obtenidos en esta tesis en donde las raíces serían un destino fuerte de fotoasimilados y retendrían gran parte de los fotoasimilados (v.g. biomasa) y N (proteínas). La posible removilización de este remanente radical, podría significar mayores rendimientos en especies de importancia agronómica.

Gastos metabólicos durante el desarrollo reproductivo

Las raíces mantienen una actividad respiratoria considerable durante el periodo de crecimiento de las semillas comprendido entre R5-R6. Esto representaría una pérdida de carbono por respiración de alrededor del 50% del peso seco final alcanzado por las semillas en R8. En soja alrededor del 8-9% del carbono proveniente de la fotosíntesis es respirado en las raíces en

estadios pre-reproductivos (Harris et al., 1985; Lambers et al., 2000). Hall et al. (1990) determinaron que el consumo respiratorio de C de las raíces de girasol puede alcanzar valores importantes, en relación con el rendimiento del cultivo. La inversión en biomasa radical y en recursos para afrontar el gasto metabólico durante el período de crecimiento de frutos y semillas, podría ser considerada como un gasto superfluo en detrimento de la inversión reproductiva. Sin embargo, el sistema radical no puede ser visto solamente como un destino de fotoasimilados ya que es la única “fuente” de agua y de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, la asimilación de NO_3^- comienza a caer de manera significativa recién en R7-R8 cuando no queda casi tejido verde y las semillas presumiblemente ya han crecido completamente. El mismo hecho ocurre con la actividad NR. Esto también puede explicar los resultados obtenidos por Gordon et al. (2000) en donde la mayoría del nitrógeno radical es retenido en raíces muertas. Estos datos sugieren que las raíces pueden incorporar NO_3^- a tasas respiratorias bajas y que estas tasas se mantienen hasta estadios terminales del desarrollo.

3.4 Conclusiones finales

Arabidopsis thaliana no parece ser una planta monocárpica típica, exhibe una cierta superposición entre crecimiento reproductivo y vegetativo y su ciclo parece estar determinado principalmente por la disponibilidad de recursos. El patrón de cambio en el metabolismo radical a lo largo del desarrollo reproductivo parece ser similar en *Arabidopsis* y en una planta típicamente monocárpica como la soja. Esto indicaría que la actividad radical no está ligada a un proceso de senescencia como el que sufren los tejidos aéreos, sino más bien al mantenimiento de esos tejidos y por lo tanto, el mantenimiento de la demanda de nutrientes y el suministro de fotoasimilados. Pese a que tradicionalmente se creía que las raíces declinaban su actividad y su crecimiento tempranamente en el desarrollo reproductivo, los datos aquí obtenidos muestran que las raíces mantienen su actividad metabólica y acumulan biomasa aún durante el crecimiento de las semillas. Por otro lado, las raíces parecerían ser el destino más fuerte de fotoasimilados en ausencia de un destino fuerte como los frutos. La falta de compensación entre la cantidad de tejido producido y la actividad metabólica en este tratamiento serían indicadores de desajustes metabólicos, y la vía de la AOX podría cumplir una función de “alivio” para el consumo en las raíces de los productos reducidos formados a través de la actividad fotosintética. La disminución de la cantidad de proteína total y mitocondrial hacia las etapas finales del crecimiento de las semillas, indica la presencia de procesos de exportación hacia estas estructuras desde las raíces. El mantenimiento de la actividad metabólica en raíces hasta estadios muy avanzados en el desarrollo, indica que las raíces, una vez muerta la parte

aérea, disminuyan su actividad sólo gradualmente a medida que experimentan una escasez de fotoasimilados por la cesación de las funciones fotosintéticas del follaje.

Capítulo VI

Respuestas de las raíces a la senescencia inducida por oscuridad.

4.1 Introducción

Las mitocondrias participan en el metabolismo primario y están involucradas tanto en el metabolismo de carbono como en el de nitrógeno. La síntesis de ATP como la de diversas moléculas que transportan poder reductor y la síntesis de esqueletos carbonados son las principales funciones de las mitocondrias (Atkin et al., 2000). Durante la senescencia estas funciones serían fundamentales para llevar a cabo el desmantelamiento de los cloroplastos y la transferencia de nutrientes hacia otros órganos en desarrollo no solamente en células del mesófilo fotosintético sino también en células oclusivas y en células no fotosintéticas como las células epidérmicas (Keech et al., 2007). La actividad respiratoria de hojas senescentes decrece fundamentalmente por una disminución en el número de mitocondrias cuando la planta entera es sometida a oscuridad, pero cuando sólo una hoja es sometida a oscuridad la actividad específica de las mitocondrias remanentes se mantiene constante (Keech et al., 2007).

Como consecuencia de la falta de luz, las plantas sufren “hambreado” de carbohidratos lo cual puede tener consecuencias importantes sobre el metabolismo mitocondrial. Esto ha sido estudiado sobre la base de distintos diseños experimentales, como por ejemplo, raíces que fueron separadas de la parte aérea (Bingham y Rees, 2008), cultivos celulares (Giegé et al., 2005) y secciones apicales aisladas de las raíces (Journet et al., 1986; Brouquisse et al., 1991; Bingham y Rees, 2008) donde existe una respuesta metabólica con el agregado de una fuente carbonada externa. Esto indica que la actividad

mitocondrial es fuertemente dependiente de la cantidad de fotoasimilados disponibles.

Por otra parte como consecuencia del hambreado de carbohidratos las mitocondrias pueden presentar cambios en su morfología. Las mitocondrias sufren cambios durante la muerte celular programada (PCD) y probablemente también cumplen un rol importante en el desarrollo de este proceso (Scott y Logan, 2007). Muchos trabajos se han focalizado en la relación entre PCD y los cambios morfo-funcionales que sufren las mitocondrias (Mach et al., 2001; Arpagaus et al., 2002; Curtis et al., 2002; Yoshinaga et al., 2005, 2006; Logan, 2008) pero las investigaciones que profundizan en el comportamiento de las mitocondrias durante la senescencia y más específicamente en las raíces son escasos. Cierta evidencia indica que podría existir una asociación entre la morfología de las mitocondrias y el hambreado de carbohidratos encontrándose mitocondrias esféricas en condiciones normales y alargadas en condiciones de hambreado en cultivos de células de *Arabidopsis* (Giegé et al., 2005). Otros trabajos, como el de Zottini et al. (2006), muestran cambios en la morfología de las mitocondrias en diferentes fases del cultivo de protoplastos de *Medicago truncatula* observándose “mitocondrias gigantes” durante las etapas de senescencia del cultivo. También, en secciones apicales de raíces de maíz diferentes fracciones de mitocondrias muestran diferentes propiedades metabólicas y estructurales, y un empobrecimiento de mitocondrias de baja densidad cuando son sometidas a hambreado de carbohidratos (Couee et al., 1992).

Los escasos antecedentes disponibles indican que las mitocondrias son degradadas durante la senescencia foliar, pero se desconocen los mecanismos

que podrían participar en este proceso. En cultivos de protoplastos, la muerte celular hacia el final de un ciclo de subcultivo parece estar asociada con cambios en la morfología de las mitocondrias, y con la expresión de MtSAG, una proteasa cisteínica mitocondrial con 50% de identidad aminoacídica respecto de la proteasa asociada a la senescencia foliar SAG12 (Zottini et al., 2006). Es posible que la degradación de mitocondrias dependa de una vía autofágica de internalización en la vacuola central (Bassham et al., 2006). En relación a esto se pudo observar que en raíces tratadas con un inhibidor de la actividad de ATPasas vacuolares, es decir, reduciendo la acidez de este compartimiento y por lo tanto su actividad lítica, se acumulan autofagosomas conteniendo mitocondrias en el interior de la vacuola central (Yoshimoto et al., 2004). Esto sugiere que la autofagia podría ser una vía normal de degradación de mitocondrias en tejidos vegetales. El mecanismo de degradación de mitocondrias durante la senescencia, de hojas u otros órganos, se desconoce por completo.

A través de la cuantificación de mitocondrias en imágenes de microscopía confocal, mediciones de la actividad metabólica mitocondrial y el análisis de proteínas y carbohidratos, en este trabajo se intentará aportar información referente a los cambios cuali-cuantitativos y metabólicos que las mitocondrias radicales experimentan durante la senescencia en *Arabidopsis thaliana*. Con esto, se abarcarán los objetivos específicos 2 y 3 mencionados en el capítulo 1:

Objetivo específico 2: Caracterizar la actividad mitocondrial durante la senescencia en las raíces.

Objetivo específico 3: Examinar los procesos involucrados en la degradación de mitocondrias durante la senescencia en raíces.

4.2 Diseño experimental

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en hidroponía (ver Capítulo II sección 2.2.1) fueron inducidas a senescer en oscuridad continua. Se realizaron dos tratamientos: 5 días (5d) de oscuridad y 10 días (10d) de oscuridad con sus respectivos controles (plantas que no fueron puestas en oscuridad) y también se muestrearon plantas en el comienzo del experimento (0d) (Figura 4.1). La temperatura, tanto de la solución nutritiva como de la cámara en oscuridad, no varió de manera significativa respecto de las plantas que permanecieron a la luz.

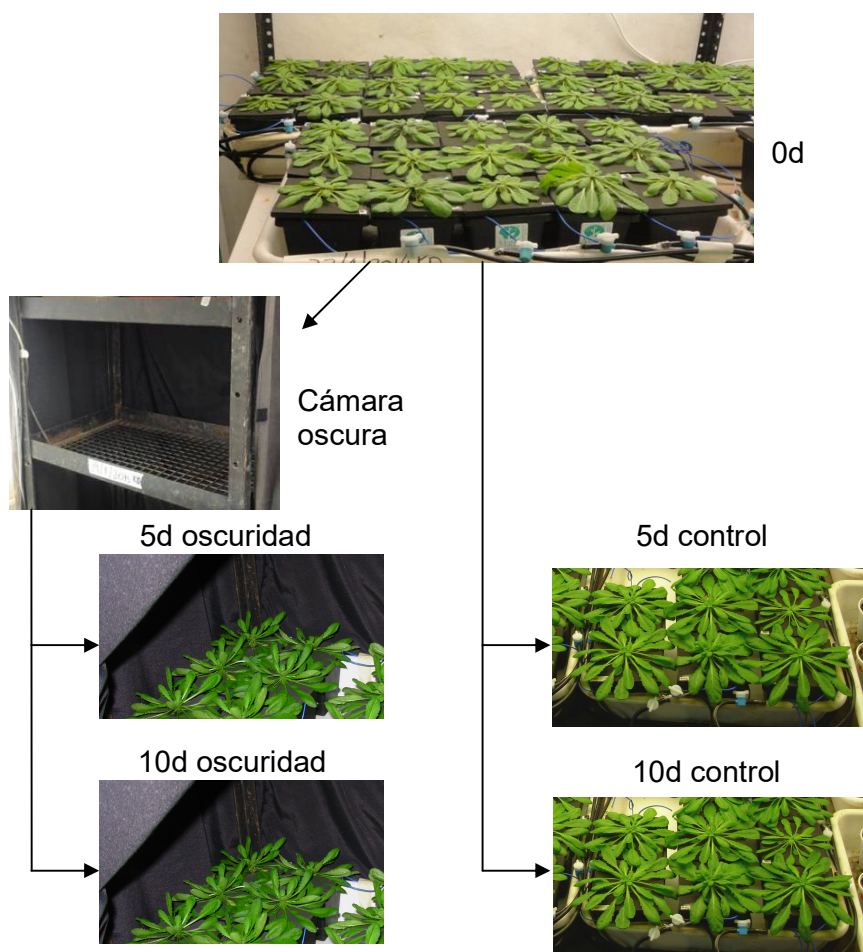


Figura 4.1. Esquema del diseño experimental para los ensayos de senescencia inducida.

Los experimentos de reversibilidad del hambre de carbohidratos fueron llevados a cabo en las mismas condiciones antes mencionadas, agregando glucosa a la solución nutritiva en una concentración final de 0,1 M. También fueron añadidos el fungicida anfotericina b 250 µg/l (Bingham y Rees, 2008) y el antibiótico ampicilina 50mg/l (Bartoli et al., 1995) para evitar la proliferación de microorganismos debida al agregado de glucosa. Los tratamientos se llevaron a cabo como se muestra en la Figura 4.2.

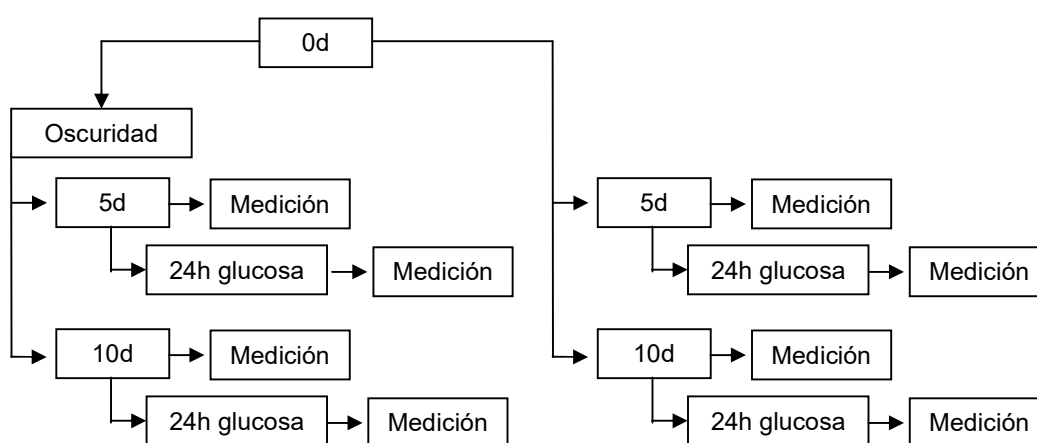


Figura 4.2. Diseño experimental de los ensayos de senescencia inducida (oscuridad) con el agregado de glucosa.

También fueron estudiados los cambios cuantitativos y cualitativos en las mitocondrias de mutantes de *Arabidopsis thaliana* en donde la vía autofágica está bloqueada. Para esto fue utilizado un mutante en el gen atg5-1 (denominado atg5-KO en las figuras y texto) generado por la inserción (aleatoria) de T-ADN en atg5 de *Arabidopsis* Col-0. Este mutante fue obtenido de la colección SAIL (Syngenta Arabidopsis Insertion Library) (Sessions et al., 2002) y caracterizado por Thompson et al. (2005) y Thompson y Vierstra. (2005). El diseño experimental fue el mismo que el descrito en la Figura 4.1.

4.3 Resultados

4.3.1 Efecto de la oscuridad en la proporción de biomasa aérea y radical

En la Figura 4.3 puede observarse el aspecto de las plantas sometidas a oscuridad continua, donde las hojas se tornaron erectas y parcialmente cloróticas. Las plantas muestran una detención del crecimiento tanto de las raíces como de la roseta a los 5d y 10d de oscuridad (Figura 4.4a y 4.4b respectivamente). Si bien no hubo diferencias significativas respecto de los pesos frescos (pf) radicales de los tratamientos en oscuridad y 0d, sí pudo observarse una pequeña disminución. Esto se refleja en la proporción de pf roseta / pf raíz, que aumenta a los 10d de incubación en oscuridad (Figura 4.4c).

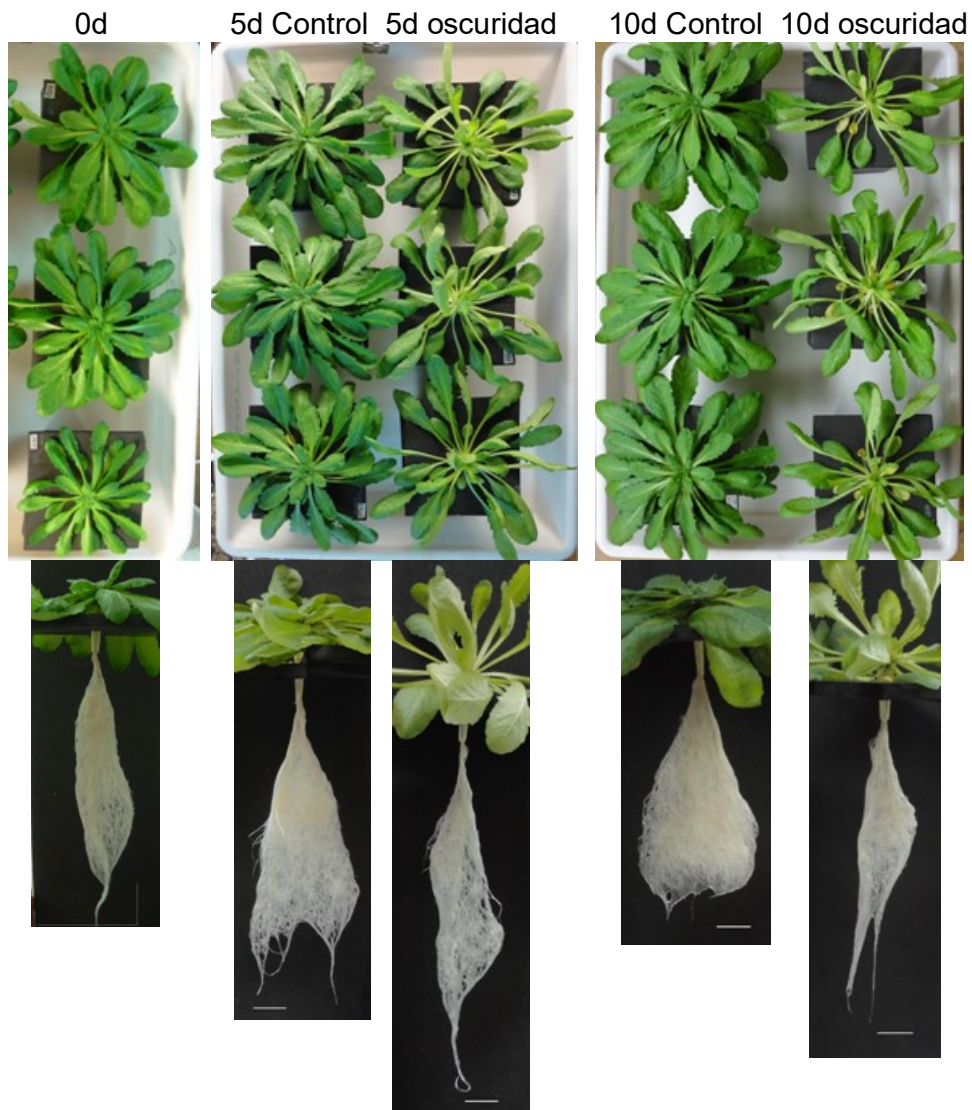


Figura 4.3. Aspecto de las plantas derivadas de los tratamientos de oscuridad (5d y 10d) y sus controles (plantas mantenidas en un régimen normal de 8h luz/16 h oscuridad). Las imágenes con fondo negro se encuentran en la misma escala (— = 2cm)

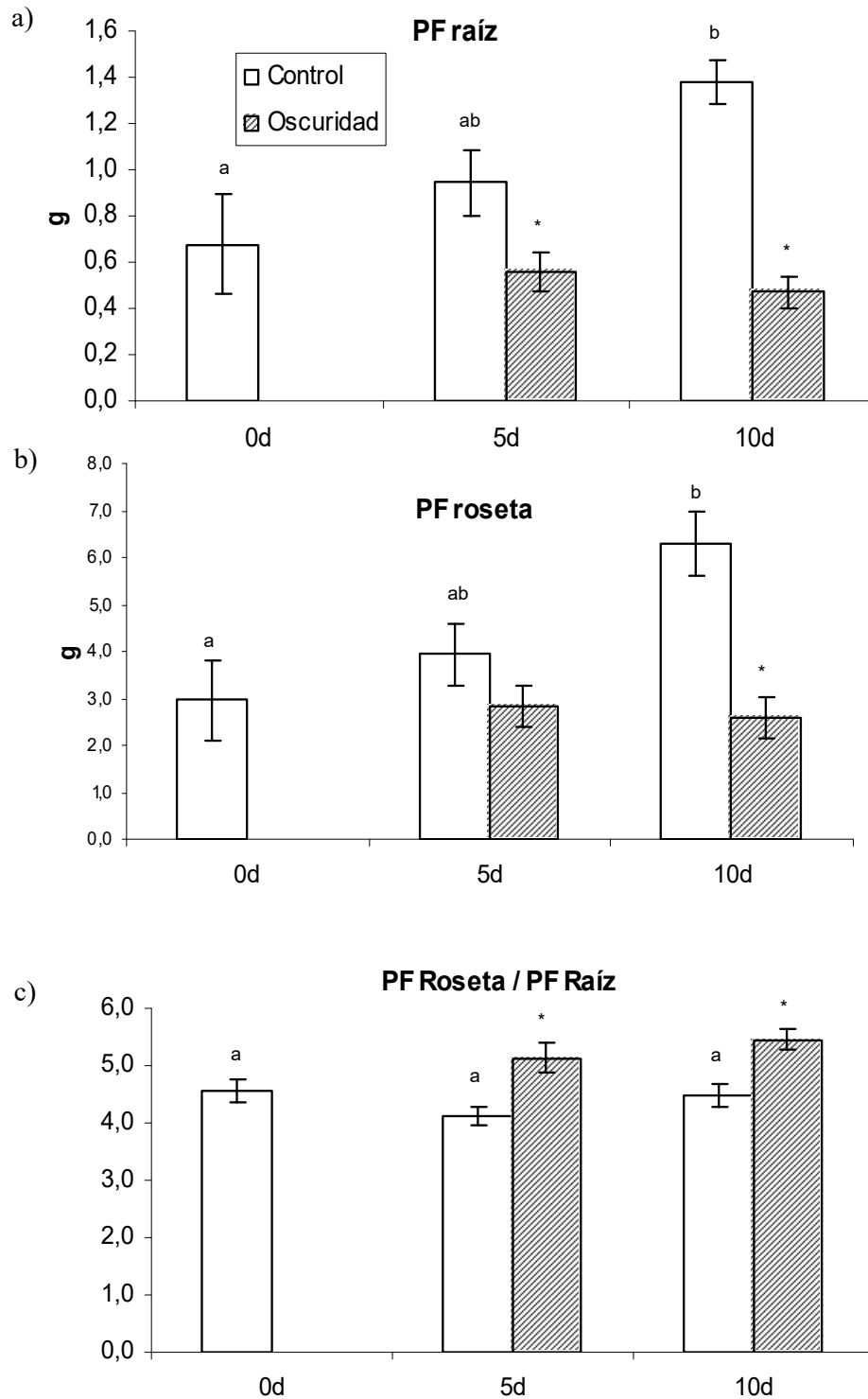


Figura 4.4. Efecto de la privación lumínica en la proporción de biomasa aérea y radical de las plantas sometidas a 5 días (5d) y 10 días (10d) de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas). Los * indican diferencias significativas respecto al control (t-student $P \leq 0,05$), para cada fecha de muestreo. PF = peso fresco

4.3.2 Actividad respiratoria y cantidad de proteínas totales y mitocondriales

La actividad respiratoria radical mostró una caída similar respecto a los controles a la luz, tanto a los 5d como a los 10d de oscuridad (Figura 4.5). Lo mismo ocurrió con las cantidades relativas de proteína total (Figura 4.6a) y mitocondrial (Figura 4.6b). Si bien se observa una mayor reducción hacia los 10d de oscuridad, la diferencias respecto a los 5d de oscuridad no son significativas (t-sudent $P \leq 0,05$). Si se grafica la cantidad de proteínas totales y mitocondriales a lo largo del período en oscuridad, la velocidad de disminución fue mayor para las proteínas mitocondriales, si bien no hubo diferencias significativas entre ambas pendientes ($P = 0,0576$) (Figura 4.6c).

Cabe destacar que las plantas que permanecieron a la luz mantuvieron una tasa respiratoria relativamente constante durante los 10 días que duró el experimento, por lo que las diferencias en relación a las plantas sometidas a oscuridad fueron debidas a los tratamientos y no a variaciones en las condiciones de medición entre muestreos o el estado de crecimiento de las plantas.

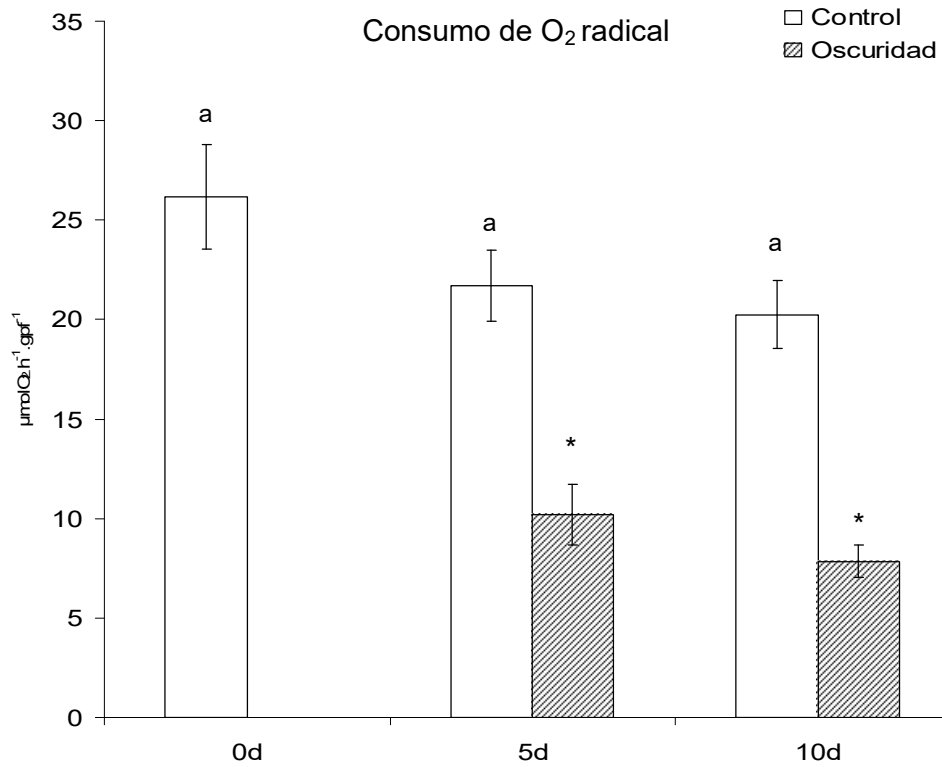
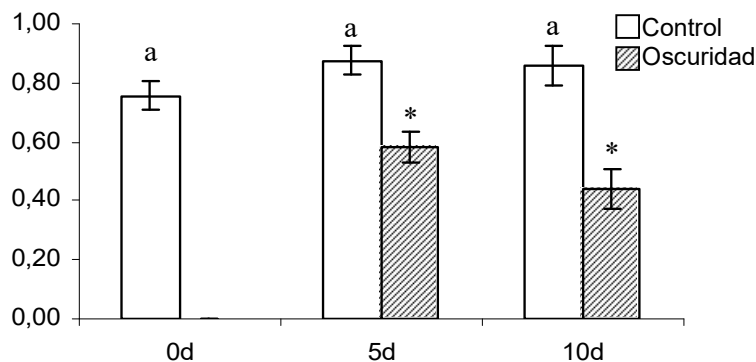
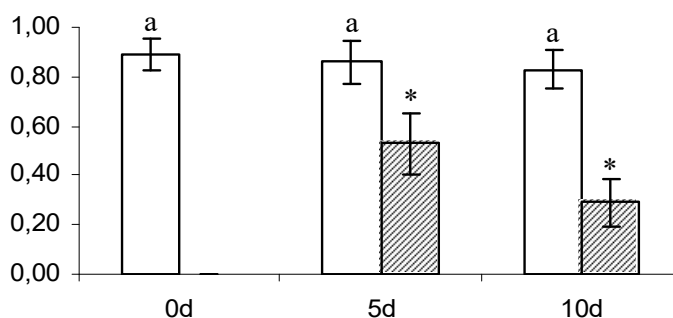


Figura 4.5. Actividad respiratoria radical (consumo de O₂) de las plantas sometidas a 5 y 10 días (5d y 10d respectivamente) de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas). Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas en los controles (ANOVA $P \leq 0,05$) y los * indican diferencias significativas respecto al control (t-student $P \leq 0,05$) para cada fecha de muestreo.

a) Cantidad relativa de proteínas totales.



b) Cantidad relativa de proteína mitocondrial (cox2)



c) Decaimiento de las proteínas totales y cox2

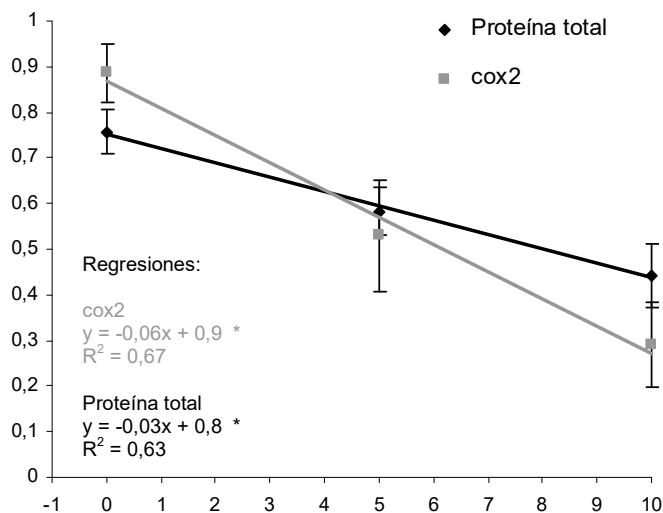


Figura 4.6. Cantidades relativas de proteínas radicales totales (a), cox2 (b), y decaimiento de ambas (c) de las raíces de plantas sometidas a 5 y 10 días (5d y 10d respectivamente) de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas). Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas en los controles (ANOVA $P \leq 0,05$). Los * indican diferencias significativas respecto al control (t-student $P \leq 0,05$). Los * en las ecuaciones indican la significancia de la regresión (t-student $P \leq 0,05$); la significancia de la diferencia entre las pendientes de las ecuaciones arrojó un $P = 0,0576$ (test F de Fisher). Los valores mostrados corresponden a la cantidad de proteína relativa al mayor valor calculado de área de ploteo resultante del análisis de los SDS-PAGE y Western blots con el programa ImageJ.

4.3.3 Cuantificación de las mitocondrias en imágenes de microscopía confocal

En la Figura 4.7 pueden verse las imágenes obtenidas con microscopía confocal correspondientes a la fluorescencia de mt-YFP (mitocondrias marcadas con YFP), Mitrotracker Red (MT, sonda que marca mitocondrias) y la colocalización de ambos. En los planos ópticos tangenciales de las células medulares de las raíces no pudieron observarse diferencias significativas en el número de mitocondrias marcadas con YFP a los 5d de oscuridad respecto de los controles, pero sí pudo verse una disminución significativa a los 10d de oscuridad respecto de su control (Figura 4.8a). También pudieron observarse diferencias significativas en las cantidades de mitocondrias marcadas con MT a los 10d de oscuridad respecto de los controles. La disminución del número de mitocondrias marcadas con MT (una sonda que requiere actividad mitocondrial y un gradiente de potencial para la marcación; Macho et al., 1996) fue mayor que la caída en mt-YFP en oscuridad. Además, existió una gran diferencia entre las mitocondrias marcadas con YFP y MT en 10d de oscuridad. El coeficiente de colocalización $M1(yfp \rightarrow mt)$ que indica la fracción de las mitocondrias que permanecen activas (es decir, marcadas con MT) cayó de manera significativa a los 10d de oscuridad (Figura 4.8b). Esto indicó que no sólo hay un menor número total de mitocondrias (marcadas con YFP) en los tratamientos de 10d de oscuridad, sino también que las mitocondrias remanentes disminuyeron su actividad.

Por otro lado, se midieron las cantidades de mitocondrias discriminadas por rangos de tamaño, a intervalos de $1 \mu m^2$ (Figura 4.9). Para las

observaciones de mt-YFP, y para el rango de tamaño de 0,5-1,5 y de 1,5-2,5 μm^2 , sólo se encontraron diferencias significativas a los 10d entre el tratamiento en oscuridad y su control. Cuando se cuantificaron las mitocondrias marcadas con MT, no hubo diferencias a los 5 d, pero a los 10 d se observó una caída significativa en el número de mitocondrias activas entre las plantas sometidas a oscuridad y sus controles, en las mitocondrias comprendidas en los rango de 0,5-1,5, 1,5-2,5 y 2.5-3.5 μm^2 , siendo estas diferencias significativas en relación al control. En los restantes rangos de tamaño también se encontraron diferencias pero los valores cuantificados fueron muy inferiores.

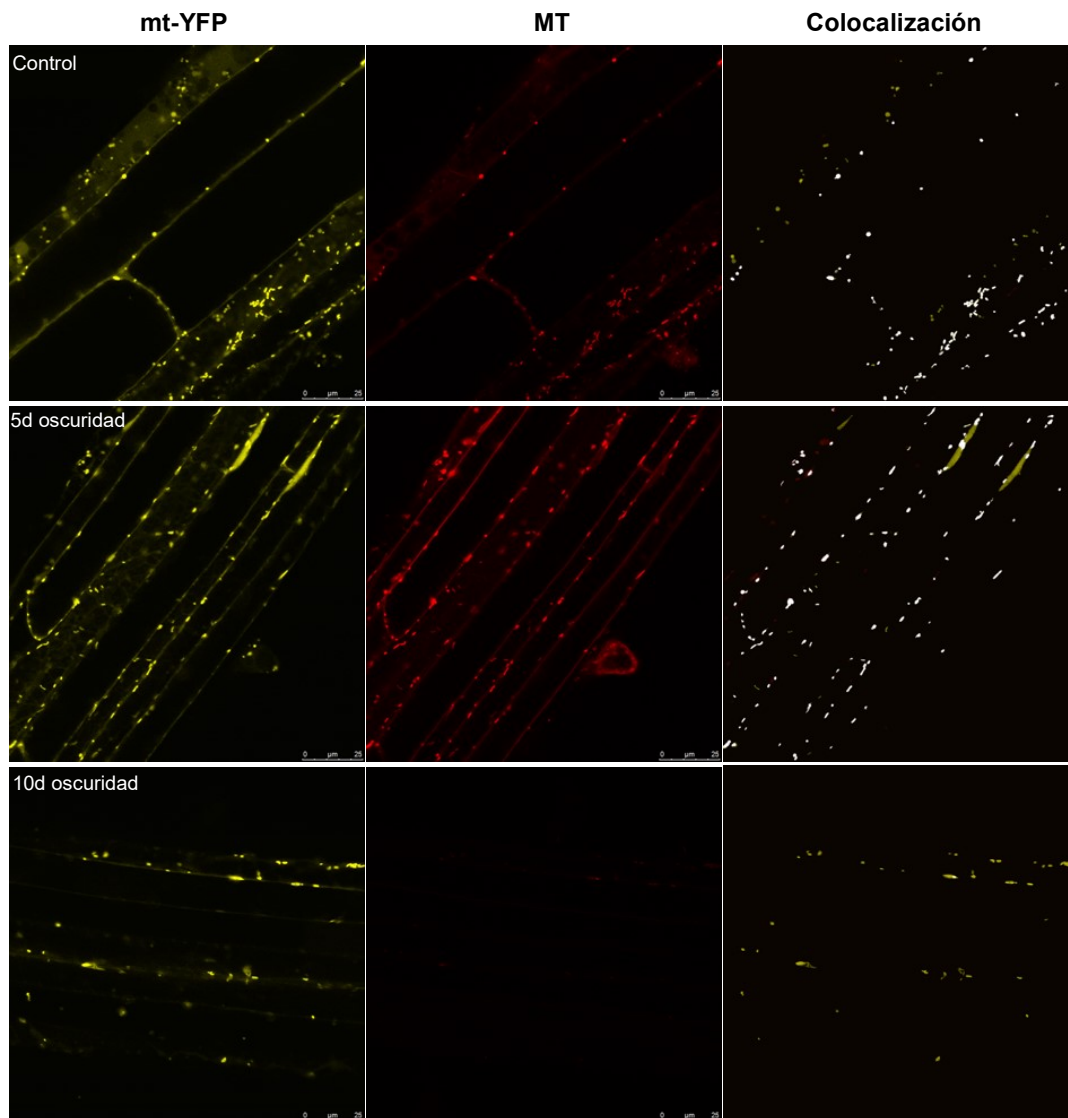


Figura 4.7. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a las raíces de plantas sometidas a 5 y 10 días (5d y 10d respectivamente) de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas). Se muestra un solo control ya que no hubo diferencias entre los controles en 5d y 10d como tampoco respecto de 0d. Las imágenes de colocalización muestran en blanco todos los píxeles que colocalizan entre los canales de mt-YFP y MT (Mitotracker Red). La escala situada en la parte inferior derecha corresponde a 25 µm

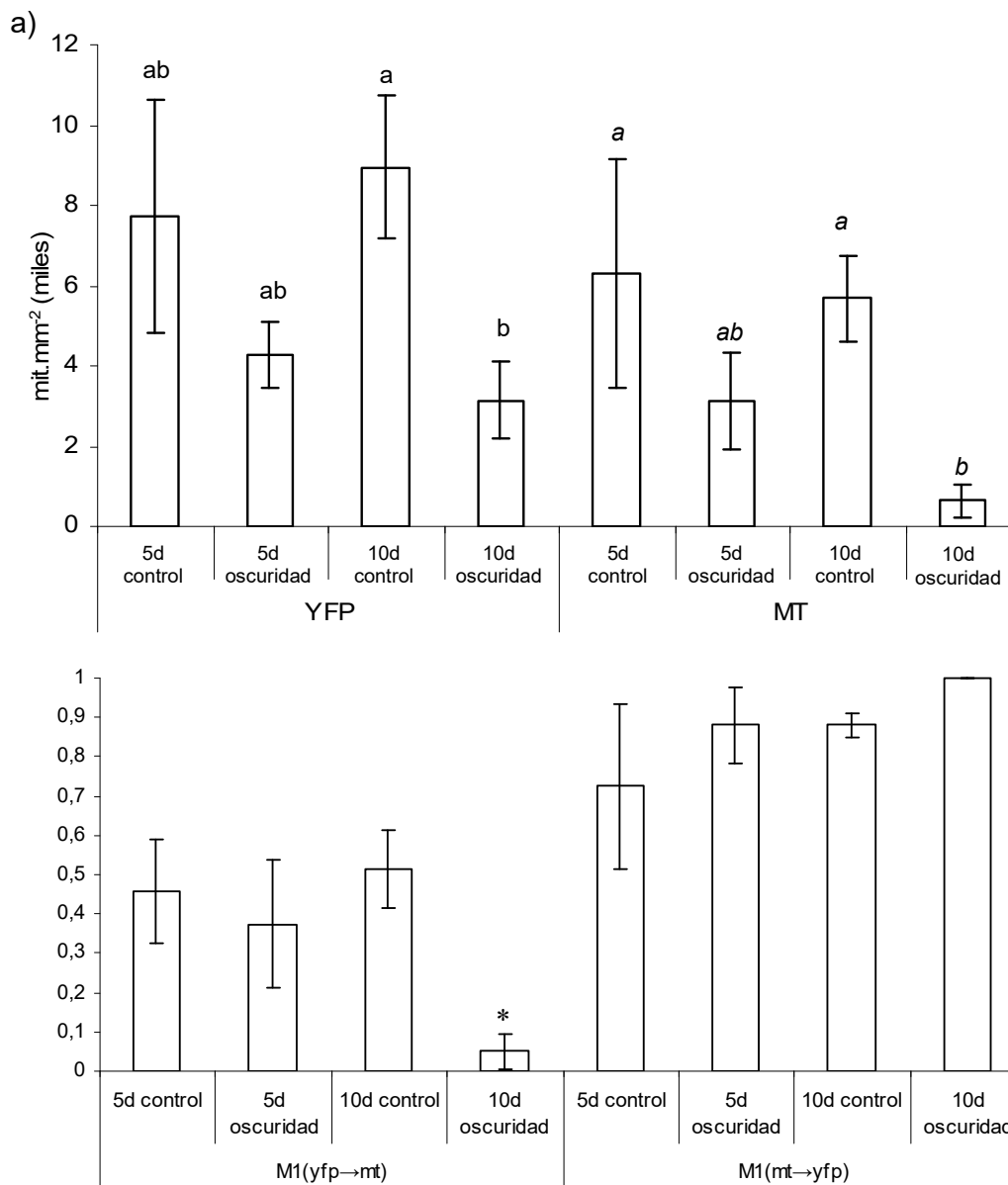


Figura 4.8. Resultados del análisis de imágenes confocales de las raíces las plantas sometidas a 5 y 10 días de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas). a) Cantidad de mitocondrias correspondientes a los canales de YFP (mt-YFP) y MT; las diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) correspondiente al test de Kruskal-Wallis. Las letras normales corresponden a diferencias en YFP y las cursivas a MT. b) Resultados del análisis de colocalización a través del coeficiente de Manders. Para este coeficiente 0 corresponde al no solapamiento y 1 refleja 100% colocalización, donde M1 (YFP→MT) corresponde al solapamiento de la señal de YFP sobre la señal de MT y M2 (MT→YFP) corresponde al solapamiento de la señal de MT sobre la señal de YFP.

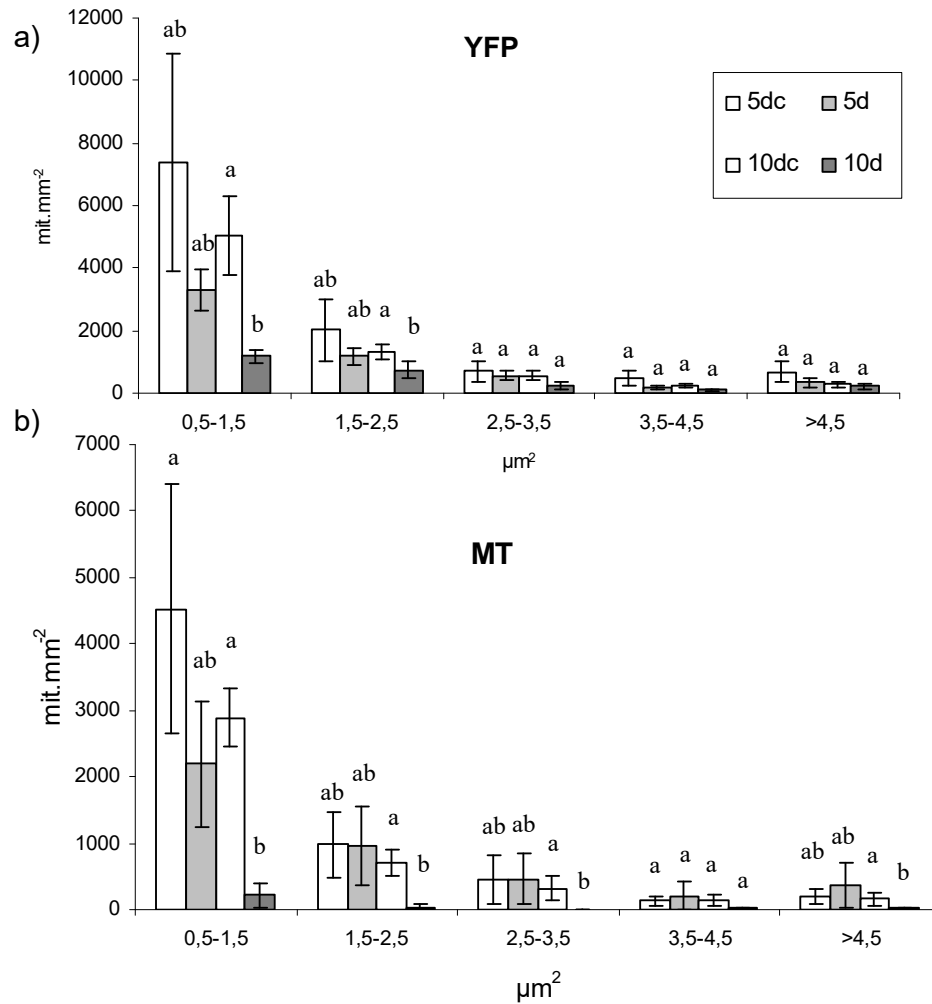


Figura 4.9. Cuantificación de las mitocondrias por tamaño de las raíces las plantas sometidas a 5 y 10 días de oscuridad y sus controles (plantas iluminadas). En a) se muestran las mitocondrias marcadas con YFP y en b) se muestran las mitocondrias marcadas con MT. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) correspondiente al test de Kruskal-Wallis dentro de cada grupo de tamaños. 5dc: 5d control, 5d: 5 días oscuridad, 10dc: 10 días control, 10d: 10 días oscuridad.

4.3.4 Cuantificación de almidón y azúcares solubles

Es posible que en las plantas sometidas al tratamiento de oscuridad continua, los niveles de carbohidratos disminuyan marcadamente, ya que el consumo no puede ser balanceado por la producción fotosintética de compuestos de carbono reducido. Para determinar en qué medida ocurrió hambreado de carbohidratos en los tratamientos de oscuridad, se midieron las variaciones en los niveles de almidón y azúcares solubles en las raíces. Las cantidades de almidón no se vieron afectadas en los tratamientos de oscuridad (Figura 4.10a) y no se encontraron diferencias respecto a los controles. Por el contrario, las cantidades de azúcares solubles disminuyeron alrededor de un 60% en las raíces de las plantas sometidas a oscuridad (Figura 4.10b). La caída en el contenido de azúcares solubles se produjo principalmente durante los primeros 5 d en oscuridad continua.

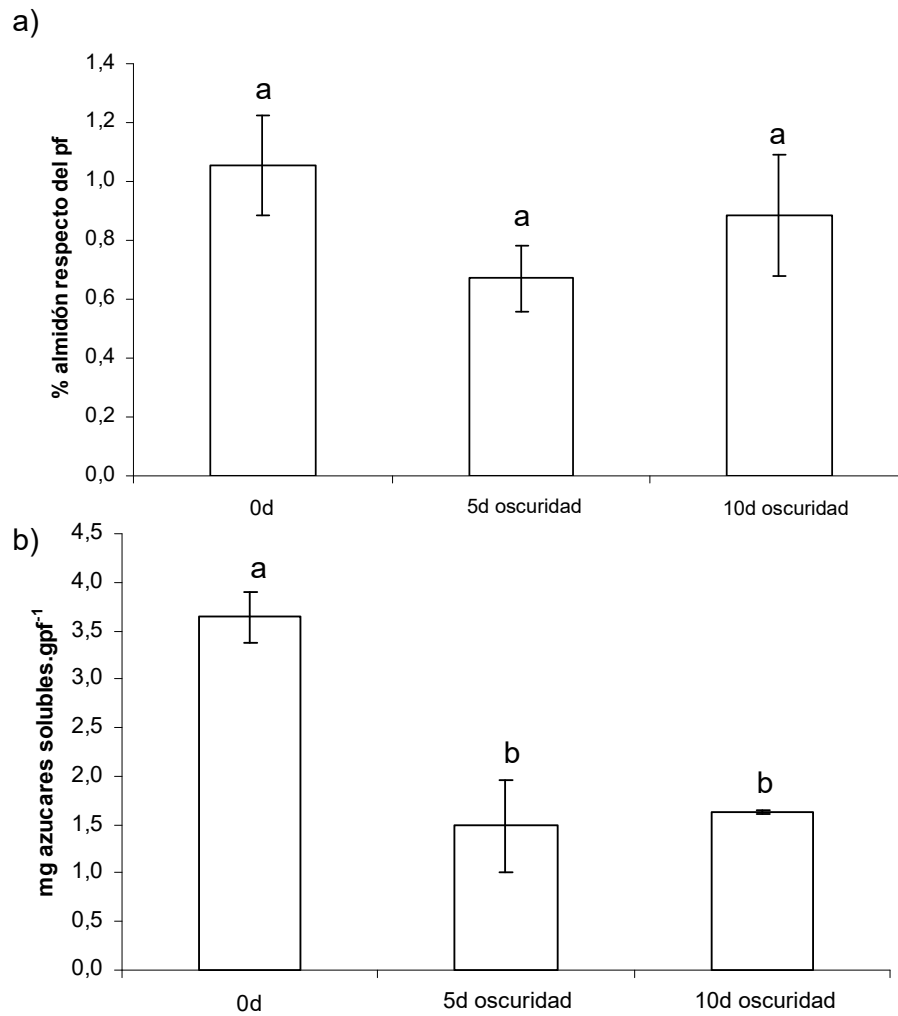


Figura 4.10. Cantidades de almidón y azúcares solubles de las raíces las plantas sometidas a 5 y 10 días de oscuridad (5d y 10d respectivamente) y sus controles (plantas iluminadas). a) Cuantificación de almidón. b) Cuantificación de azúcares solubles. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) derivadas del ANOVA.

4.3.5 Efecto del agregado de glucosa

La disminución del contenido de azúcares solubles tras 5 d de incubación en oscuridad sugiere que la caída en la actividad respiratoria de las raíces puede ser simplemente el resultado de una menor disponibilidad de sustratos respiratorios. Para evaluar esta hipótesis se intentó revertir la caída de la actividad respiratoria agregando glucosa exógenamente. El agregado de 0,1 M de glucosa a la solución nutritiva y la incubación de las plantas por 24hs produjo un aumento significativo en la tasa respiratoria de las raíces en todos los tratamientos (Figura 4.11). Sin embargo, el agregado de glucosa no alcanzó a revertir completamente la disminución de la respiración (por ejemplo, la respiración de las raíces mantenidas 5d en oscuridad fue menor que en sus controles a la luz, aún después del agregado de glucosa exógena). Por otro lado, no se observaron cambios ni en el número de mitocondrias totales, ni en el número de mitocondrias activas, como tampoco se hallaron cambios en la distribución de tamaños de las mitocondrias totales (datos no mostrados).

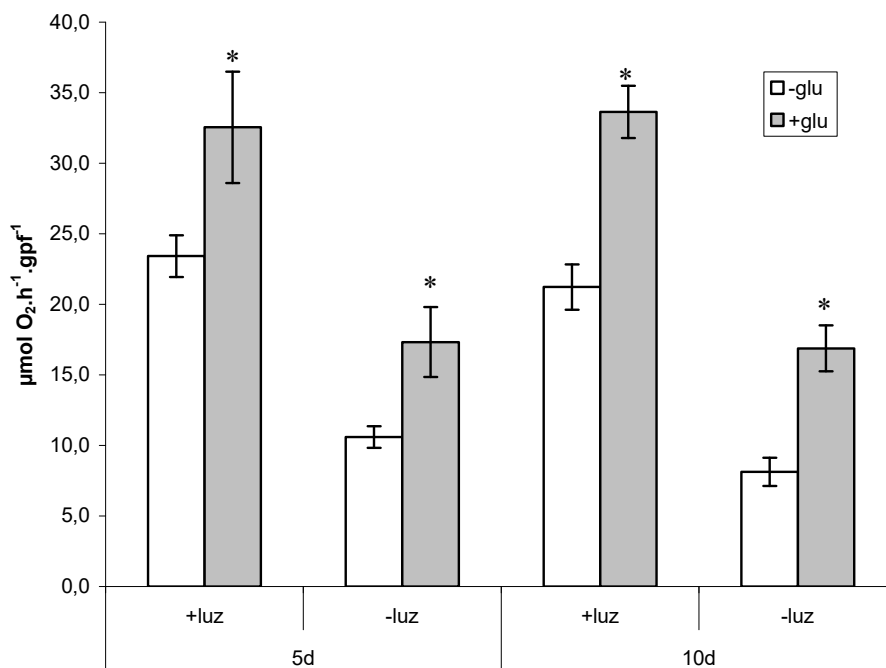


Figura 4.11. Consumo de oxígeno de las raíces las plantas sometidas a 5 y 10 días de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas) combinados con el agregado de glucosa 0,1 M. Los * indican diferencias (t-student $P \leq 0,05$) entre los tratamientos con glucosa (+glu) y sin glucosa (-glu). +luz indica que las plantas fueron mantenidas iluminadas y -luz indica que las plantas permanecieron en oscuridad.

4.3.6 Efecto de la oscuridad en mutantes atg5-KO

La disminución del número de mitocondrias (Figura 4.8) y del contenido de proteínas mitocondriales (Figura 4.6b) en las raíces de plantas sometidas a oscuridad podría ocurrir a través de una vía degradativa autofágica. Para evaluar esta hipótesis se examinaron las respuestas al tratamiento de oscuridad de las raíces del mutante atg5-KO, donde la vía autofágica está completamente inhibida (Thompson et al., 2005; Thompson y Vierstra, 2005). En la Figura 4.12 puede observarse el aspecto de las plantas en donde las hojas se tornaron erectas y cloróticas al igual que lo mostrado en los anteriores ensayos de oscuridad (Figura 4.3), tanto en la línea salvaje como en el mutante atg5-KO. Sin embargo, los mutantes atg5-KO a los 10d de oscuridad se tornaron extremadamente cloróticos y las raíces se necrosaron por completo (Figura 4.13a) alterando la organización celular en donde la pérdida del lumen celular provocó que sólo se pueda observar el tejido remanente del haz vascular y restos de las paredes celulares correspondientes a otros tejidos (Figura 4.13b). Por este motivo los datos mostrados a continuación sólo corresponden a 0d y 5d.

Las plantas atg5-KO mostraron una disminución significativa en la biomasa radical respecto de las plantas controles wt (plantas sin modificaciones en la ruta autofágica) en 5d de oscuridad y de sus controles (Figura 4.14a). La biomasa de la roseta arrojó un patrón similar al de las raíces, pero con diferencias significativas también al comienzo del tratamiento de oscuridad (0d). En términos generales las plantas atg5-KO acumularon menor biomasa que las wt (Figura 4.14b). La relación pf roseta / pf raíz reflejó una redistribución desigual de biomasa en 5d y sus controles entre wt y atg5 (Figura

4.14c). No se vieron diferencias en las tasas de consumo de oxígeno entre wt y *atg5-KO* (Figura 4.15) repitiendo el mismo patrón que se muestra en la Figura 4.5.

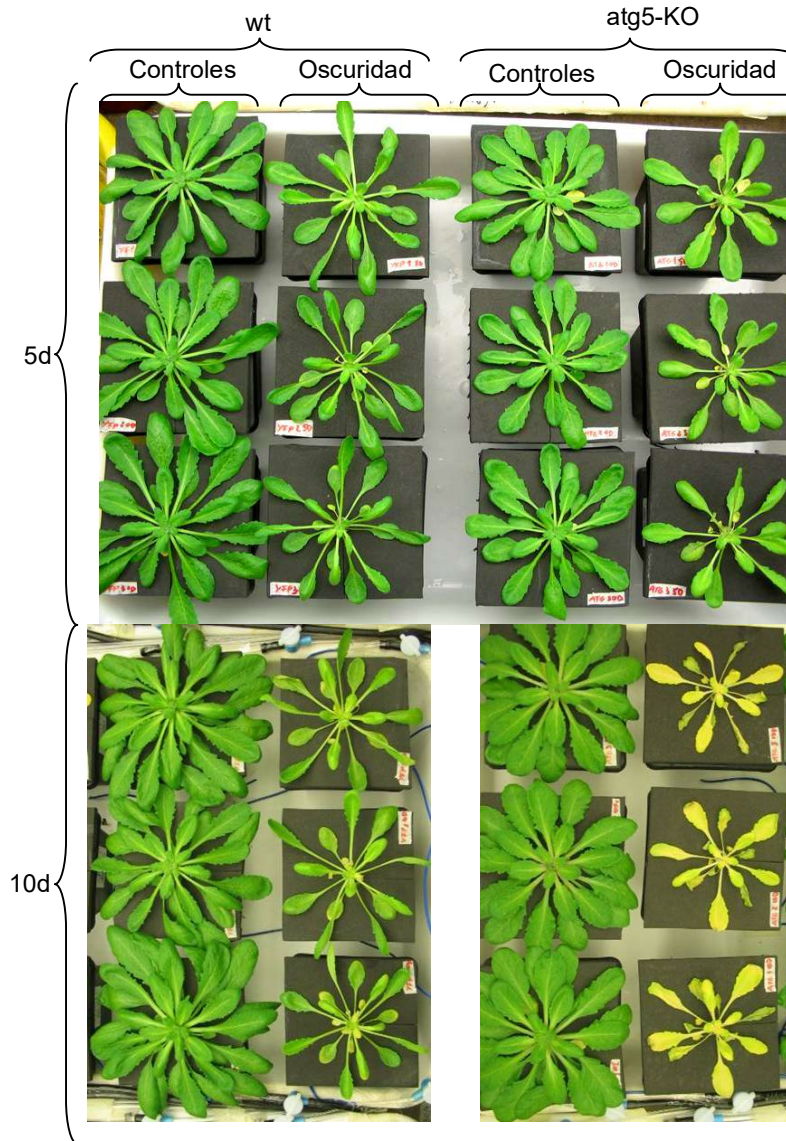


Figura 4.12. Aspecto de las plantas wt (genotipo salvaje) y *atg5-KO* (mutantes de la vía autofágica) sometidas a 5 y 10 días (5 y 10d) de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas).

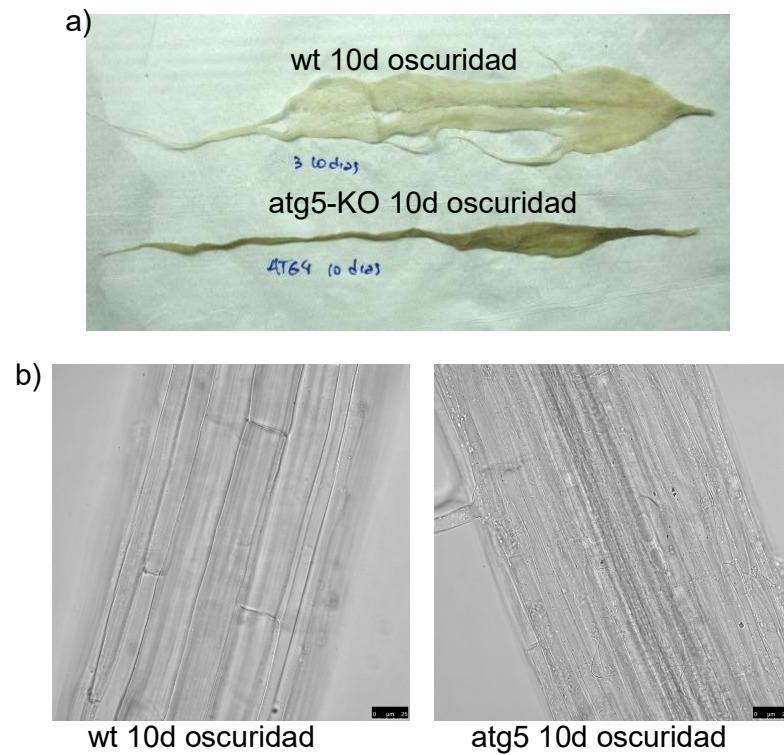


Figura 4.13. Imágenes de las raíces de *atg5* sometidas a 10 días (10d) de oscuridad en comparación con *wt* (genotipo salvaje). a) Aspecto de las raíces. b) Fotografías microscópicas de las raíces (la escala situada en la parte inferior derecha corresponde a 25 μ m)

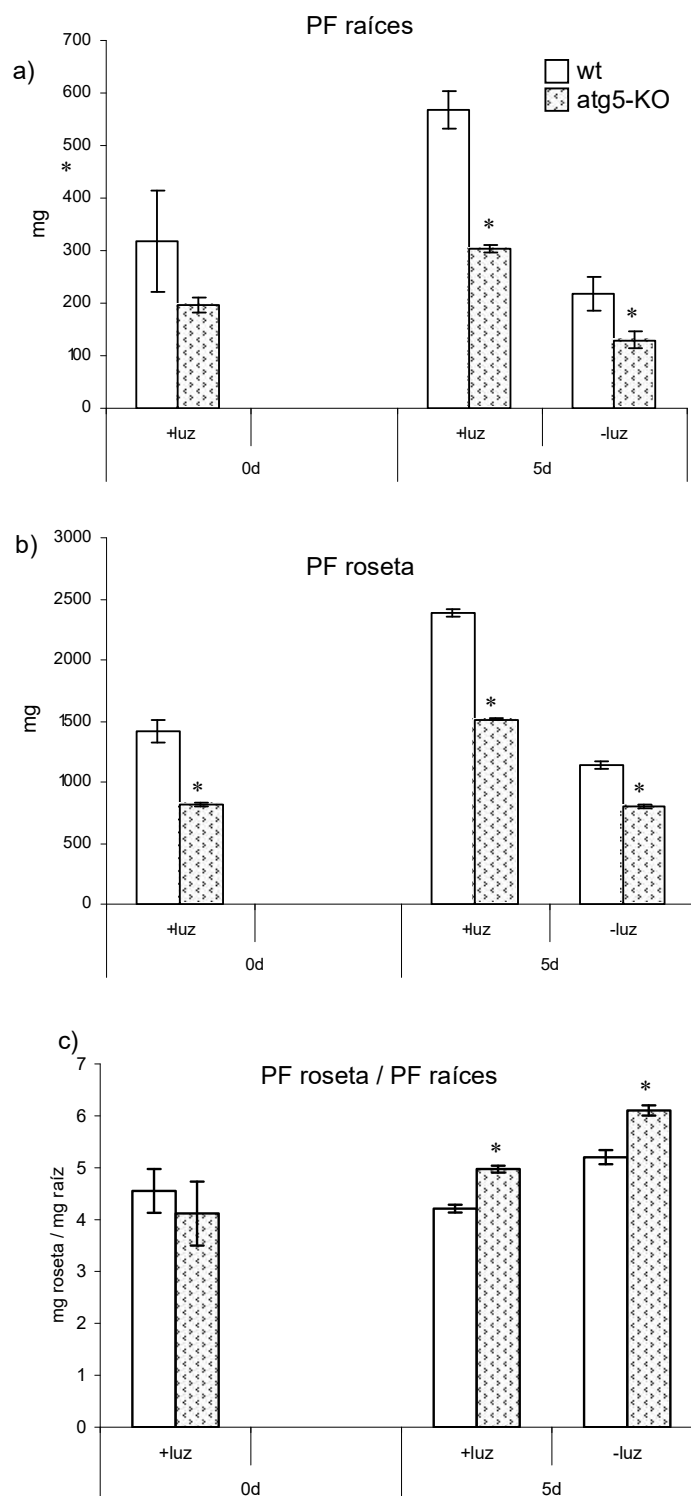


Figura 4.14. Variaciones en la biomasa de plantas atg5-KO comparadas con wt en los tratamientos de oscuridad. a) Biomasa de raíces. b) Biomasa de la roseta. c) Relación entre la biomasa de la roseta y la biomasa radical. Los * indican diferencias significativas respecto al control (t student $P \leq 0,05$). +luz indica que las plantas fueron mantenidas iluminadas y -luz indica que las plantas permanecieron en oscuridad.

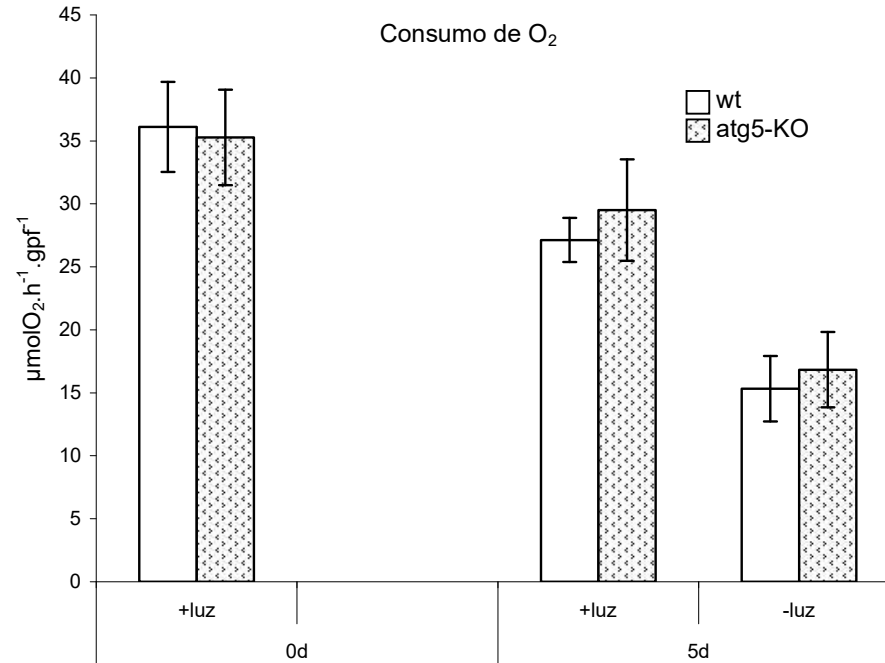


Figura 4.15. Consumo de oxígeno de las raíces de plantas sometidas a 5d de oscuridad y sus controles (plantas que permanecieron iluminadas) en atg5-KO comparadas con plantas wt. No se encontraron diferencias significativas entre wt y atg5-KO (t student $P \leq 0,05$). Cabe aclarar que el patrón de respiración antes observado para el genotipo salvaje (wt) se mantuvo, habiendo diferencias significativas sólo en 5d de oscuridad respecto de los controles (entre 0d y 5d +luz no se hallaron diferencias significativas, t-student $P \leq 0,05$). +luz indica que las plantas fueron mantenidas iluminadas y -luz indica que las plantas permanecieron en oscuridad

4.4 Discusión

En el presente capítulo se estudiaron aspectos estructurales y metabólicos de las mitocondrias radicales durante la senescencia inducida por oscuridad. Se cuantificó el consumo de O₂, la cantidad de proteínas, la cantidad de azúcares solubles e insolubles (almidón) y se analizaron las mitocondrias por microscopía confocal. Con el fin de dilucidar la existencia de un efecto de hambreado de carbohidratos se realizaron ensayos incubando plantas con una fuente carbonada (glucosa). Por otro lado fueron utilizados mutantes de la vía autofágica (atg5) para estudiar la implicancia del proceso de autofagia en la dinámica mitocondrial.

4.4.1 Efecto de la oscuridad en la proporción de biomasa aérea y radical

Tanto el crecimiento de la biomasa radical como la de la roseta de detuvieron como producto del tratamiento de oscuridad. La relación pf roseta/ pf raíz se vió incrementada a los 10 días de tratamiento lo que sugeriría una disminución preferencial de la biomasa radical, ya sea por una redistribución de materia orgánica a otras partes de la planta o por el costo de mantenimiento mismo de las raíces. Debido a que las cantidades de almidón no se vieron afectadas, el costo de mantenimiento de las raíces podría no ser un factor importante. Por lo tanto estos resultados podrían indicar una redistribución de recursos desde la raíz para mantener el tejido fotosintético que permanece inactivo en oscuridad.

Las raíces de *Arabidopsis thaliana* presentan respuestas fotomorfogénicas durante la germinación y el desarrollo temprano, dependiendo el crecimiento de las condiciones lumínicas (Nemhauser y Chory, 2002). Sin embargo, los datos mostrados en este capítulo fueron obtenidos en plantas que se desarrollaron durante un período de tiempo considerable y cuyas demandas fisiológicas distan de las plántulas de unos pocos días desde su germinación. En la bibliografía existente no abundan los trabajos científicos donde se estudien los cambios fotomorfogénicos en la raíces de plantas con un desarrollo como los de este trabajo. Es sabido que varias respuestas fotomorfogénicas en *Arabidopsis thaliana* están reguladas por los fitocromos (Whitelam y Devlin, 1997). En plantas mutantes de pepino (*Cucumis Sativus*) la pérdida de Fitocromo b conduce a una redistribución de la biomasa, donde las hojas y las raíces son más pequeñas comparadas con plantas no mutantes, mientras que el hipocotilo y los pecíolos incrementan su tamaño (López-Juez y Devlin, 2008). En mutantes del fitocromo b de *Arabidopsis thaliana* tanto la biomasa radical como la proporción de raíces respecto de la biomasa aérea son menores comparadas con plantas no mutantes (Salisbury et al., 2007). La redistribución de biomasa en plantas sometidas 5d y 10d de oscuridad, podría deberse en parte a cambios fotomorfogénicos.

4.4.2 Cambios en la cantidad y actividad mitocondrial en raíces de plantas sometidas a oscuridad

Un rasgo observado durante la senescencia en raíces es una caída en la actividad respiratoria. Datos similares fueron obtenidos por Bingham y Rees

(2008) en plantas de trébol (*Trifolium pratense*). Tanto el número como la actividad de las mitocondrias serían responsables de ello. La caída obtenida en el número de mitocondrias totales (marcadas con YFP) y la mayor disminución en el número de mitocondrias activas (marcadas con MT) se correspondió con una disminución en la cantidad de proteínas mitocondriales y totales, pero no así con una baja en el consumo de O_2 en oscuridad prolongada (10d respecto de 5d). Debido a que la fluorescencia emitida por el MT depende del potencial de membrana mitocondrial (Macho et al., 1996) las diferencias de señal respecto de YFP en mitocondrias de raíces 10d probablemente esté vinculada a una caída en el potencial de membrana mitocondrial en donde el consumo de O_2 medido corresponde en gran medida a un tipo de respiración no acoplada (v.g., la vía de la oxidasa alternativa). Por otra parte, la cantidad de mitocondrias y el consumo de O_2 no siempre se relacionan de manera positiva. En condiciones de alta concentración de CO_2 varias especies de plantas incrementan el número de mitocondrias pero disminuyen las tasas respiratorias (Griffin et al., 2001). Con esto no parece posible atribuir las variaciones en el consumo de O_2 únicamente a la cantidad de mitocondrias.

Trabajos como el de Keech et al. (2007) muestran en hojas resultados similares a los aquí expuestos para raíces, donde la disminución en la cantidad de mitocondrias como también en la actividad metabólica es evidente en hojas de plantas que estuvieron sometidas a oscuridad por 6 días. Sin embargo, escasean los trabajos en los cuales se aborde el sistema radical. Según Bingham y Rees (2008), en raíces de trébol que fueron separadas de la parte aérea el consumo de O_2 no decayó entre los 7 y 12 días luego de la escisión, pero sí la cantidad de proteínas totales. Estos resultados pueden compararse a

los obtenidos aquí pero con otro sistema experimental donde raíces que fueron separadas de la parte aérea serían comparables con raíces de plantas que fueron sometidas a oscuridad por un tiempo prolongado. En ambos casos habría un déficit de aportes de los tejidos fotosintéticos hacia las raíces.

Por otra parte, se ha estudiado que en raíces de maíz existen distintas fracciones mitocondriales de distinta densidad con diferentes propiedades metabólicas y estructurales como el consumo de O₂, contenido de proteínas, actividad enzimática y cantidad de crestas en la membrana interna (Couee et al. 2005). Quizás estas mismas características podrían explicar las diferencias encontradas entre las poblaciones de mitocondrias activas y no activas en esta tesis, pero estas cuestiones deberán ser estudiadas en mayor profundidad.

4.4.3 Tamaño de las mitocondrias radicales en oscuridad prolongada

Las mitocondrias son organelas pleomórficas que constituyen una mezcla heterogénea de morfologías en una célula dada (Logan, 2007). Los diferentes tamaños y morfologías parecen estar regulados por distintos genes (Logan et al., 2003). Tres hechos parecen evidentes cuando se observan mitocondrias marcadas con proteínas fluorescentes: i) no se distribuyen uniformemente en el citoplasma ii) no tienen el mismo tamaño y forma, y iii) pueden ser altamente dinámicas, cambiando de forma y posición (Logan y Leaver, 2000). Los datos obtenidos en este trabajo muestran cambios, sobre todo del punto ii), en mitocondrias radicales durante la senescencia inducida por oscuridad.

Las mitocondrias presentaron heterogeneidad de tamaño en todos los tratamientos, siendo más abundantes, tanto en su *pool* total como en su *pool* activo, las de menor tamaño. Existen evidencias que indican que ocurre un cambio en la morfología y un aumento en el tamaño de las mitocondrias en el contexto de la finalización del ciclo celular (Giegé et al., 2005; Yoshinaga et al., 2005; Zottini et al., 2006; Scott y Logan, 2008). Estas evidencias se recogieron sobre la base de sistemas experimentales diferentes al utilizado en este trabajo (cultivo de células, cultivo de protoplastos, discos de hojas, etc.) y con el agregado de compuestos inductores de especies reactivas del oxígeno (ERO), lo cual puede significar diferencias en el comportamiento celular. Algunos estudios sugieren que el tamaño de las mitocondrias no se ve afectado durante el desarrollo foliar en células epidérmicas (Armstrong et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las mitocondrias más pequeñas son las que mayor disminución presentaron durante los tratamientos en oscuridad y por tanto serían, en gran parte, las responsables de la mayor actividad metabólica en las plantas controles, mantenidas a la luz. Por otro lado, es preciso remarcar que no sólo existen conjuntos de mitocondrias que se diferencian por su morfología y tamaño, sino que parece evidente que existen conjuntos diferenciados por su actividad. Esto se ve claramente en las imágenes confocales de las raíces de plantas mantenidas en oscuridad durante 10d donde muy pocas o ninguna mitocondria fue marcada con MT. Hay que remarcar que estos datos se obtuvieron sobre la base de un corte óptico específico que correspondió a un tipo celular. Las propiedades de las mitocondrias de otros tipos celulares podrían estar influyendo en la actividad respiratoria global de la raíz, cuantificada en este trabajo. De esta manera

podría explicarse la falta de relación entre el consumo de O_2 y la cantidad de mitocondrias activas en 10d de oscuridad. Por otra parte, es interesante remarcar que las diferencias en el número de mitocondrias activas y totales parecen indicar que existen conjuntos de mitocondrias con actividades basales o en “*standby*”. Hasta el momento no existen antecedentes en este sentido.

4.4.4 Caída de la respiración radical y cambios en las concentraciones de azúcares solubles y almidón

La senescencia anticipada de las hojas en plantas de *Arabidopsis thaliana* sugiere que las raíces experimentan una disminución de su actividad por falta de fotoasimilados. Los tratamientos de oscuridad produjeron una caída de la actividad mitocondrial que podría deberse a la falta de carbohidratos provenientes de las hojas. Para evaluar esta hipótesis se analizaron los cambios en las cantidades de almidón y azúcares solubles en raíces de plantas sometidas a oscuridad. Debido a que la concentración de almidón no se vio modificada en los tratamientos de 5d y 10d de oscuridad con respecto de 0d, pero sí disminuyeron las cantidades de azúcares solubles, podrían ser estos últimos los responsables de la caída de la actividad mitocondrial. Bingham y Ress (2008) obtuvieron resultados similares con raíces de trébol que fueron separadas de la parte aérea y que pudieron mantener una actividad respiratoria durante un largo período (más de 30 días) al ser mantenidas en solución nutritiva con sacarosa. Por otro lado, las plantas que no fueron suplementadas con sacarosa, disminuyeron de manera constante la concentración de azúcares solubles, pero el contenido de almidón disminuyó solamente en los primeros

dos días luego de separar las raíces de la parte aérea, y luego se mantuvo constante (Bingham y Ress, 2008). En plantas de soja, las raíces parecen consumir todo el almidón cuando la planta permanece un día en oscuridad (Keer et al. 1985) y en cultivo de protoplastos de sicomoro (*Ficus sycomorus*) sometidas a hambreado de sacarosa se puede ver una caída en las cantidades de almidón a partir de las 10 hs de tratamiento (Journet et al. 1986). Estas diferencias podrían explicarse por los sistemas experimentales y especies utilizadas. Sin embargo, en todos los casos la disminución de los azúcares solubles (o por lo menos los de mayor relevancia) fue más notoria que la de almidón.

El aumento del consumo de oxígeno en plantas suplementadas con glucosa 0,1 M pondría en evidencia que la disminución del contenido de azúcares es una de las causas de la caída de la respiración radical en plantas mantenidas en oscuridad. Algunos sistemas experimentales donde se provoca hambreado de carbohidratos muestran una respuesta marcada de la actividad mitocondrial al agregado de una fuente carbonada (Journet et al., 1986; Roby et al., 1987; Bronquise et al., 1991, 1998, 2007; Couee et al., 1992; Giegé et al., 2005). Sin embargo la falta de respuesta en la tinción con MT del tratamiento de 10d con el añadido de glucosa probablemente pueda deberse a que 1 día de incubación no sea suficiente para restituir los potenciales de membrana mitocondriales, pero sí para aumentar el consumo de O₂ no acoplado. También podría suceder que, en parte, el pequeño *pool* activo de mitocondrias incremente su actividad específica.

Existe evidencia de que la incubación de raíces por 24 horas en sacarosa 100 mM inmediatamente luego de separarlas de la parte aérea

previene la caída de la tasa respiratoria, pero la adición de sacarosa es completamente inefectiva si es adicionada 4 días después (Bingham y Rees, 2008). Resultados similares fueron encontrados en cultivos de células de sicomoros (Journet et al., 1986) y en raíces de maíz donde la declinación de la tasa respiratoria sólo pudo revertirse con el agregado de glucosa 0,2 M hasta las 80-90 horas (4 días aproximadamente) de iniciado el hambreado (Brouquisse et al., 1991). Sin embargo, el contraste con los resultados aquí obtenidos podría deberse a las diferencias en las respuestas metabólicas entre células cultivadas, órganos (o parte de órganos) aislados y una planta entera (como fue utilizado en este trabajo).

En cultivos de células de *Arabidopsis thaliana* con mitocondrias marcadas con GFP, a las 48 horas de hambreado la intensidad de la fluorescencia cae un 48% y esto se revierte en 24 horas por la adición de sacarosa, lo mismo ocurre con la tasa respiratoria y la cantidad de la proteína mitocondrial pATP2 (Giegé et al., 2005). Sin embargo, en este trabajo de tesis no se detectaron diferencias de intensidad de YFP entre las mitocondrias de raíces de plantas que estuvieron a la luz o la oscuridad (datos no mostrados). Quizás la diferencia radique en la forma de cuantificar la intensidad ya que si se suma la intensidad por campo visual de cada píxel, habrá más píxeles por campo visual con señal de YFP en plantas que tengan más mitocondrias (en este caso plantas a la luz) pero al normalizar por la señal de cada mitocondria estas diferencias se diluyen.

Los azúcares solubles podrían actuar como señalizadores (Rolland et al., 2006; Giegé et al., 2005) de procesos metabólicos al tiempo que actúan como fuente de energía. Debido a las concentraciones de glucosa utilizadas en los

ensayos presentados en este capítulo, ésta funcionaría principalmente como una fuente de energía aunque la función como señalizador no puede descartarse.

4.4.5 Participación de la autofagia en la degradación de mitocondrias

El estudio con mutantes *knock out* (KO) en la vía autofágica (i.e., atg5-KO de *Arabidopsis thaliana*) no arrojó resultados concluyentes respecto de la participación de esta vía en la degradación de mitocondrias radicales. La mayor proporción de la biomasa aérea respecto de la biomasa radical en los mutantes atg5-KO respecto de los controles en 5d podría indicar un desmantelamiento o muerte acelerada de las raíces comparadas con los tejidos fotosintéticos en el mutante atg5-KO. Es sabido que los mutantes en el gen ATG5 presentan un fenotipo de senescencia acelerada de la roseta (Thompson et al., 2005). Esta situación podría ser más evidente en las raíces. En raíces sometidas a 10d de oscuridad no se pudieron obtener cuantificaciones confiables debido al alto grado de deterioro de los tejidos. Este hecho también muestra la aceleración de la muerte radical en el mutante de la vía autofágica.

4.6 Conclusiones finales

Los datos del presente capítulo muestran que la actividad metabólica de las raíces de plantas senescentes parece tener cierto grado de dependencia en cuanto al aporte de fotoasimilados de los tejidos fotosintéticos. También la repartición de biomasa entre las raíces y los tejidos fotosintéticos se modificaría (ya sea por redistribución o por mayor degradación en raíces) con el sometimiento a oscuridad prolongada. A esto se suma una caída en la actividad respiratoria, en cantidad de proteína mitocondrial, y en el número total de mitocondrias (principalmente las menor rango de tamaño). Debido a que las mitocondrias más pequeñas son la que se encuentran en mayor abundancia y las que más cambian en su cantidad debido a los tratamientos de oscuridad, podrían ser las que más contribuyen a la actividad respiratoria radical. Las diferencias en el número de mitocondrias activas y totales parecen indicar que existen conjuntos de mitocondrias con actividades basales o en “*standby*”. Por otro lado, los descensos de los contenidos de azúcares solubles podrían ser los responsables de las caídas de las tasas metabólicas ya que ejercerían un efecto de hambre, aunque restaría entender en que medida podrían actuar como señalizadores de procesos metabólicos. Con la información obtenida, no se puede afirmar la participación de la vía autofágica en la degradación de mitocondrias radicales, pero podría ocurrir una muerte acelerada de las raíces respecto de la roseta. Serán necesarios futuros estudios para dilucidar estas cuestiones en profundidad.

Capítulo V

Conclusiones finales

5.1 Cumplimiento de objetivos y evaluación de la hipótesis general de trabajo

La presente tesis tuvo como objetivo general la determinación de las modificaciones funcionales y estructurales que sufren las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces. Debido al vacío en el conocimiento de la fisiología de las raíces en el contexto de la senescencia, se puso especial atención a la determinación de los cambios que ocurren en este órgano. La utilización de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* permitió abordar de manera adecuada los objetivos planteados.

Del objetivo general se derivaron tres objetivos específicos que se describirán a continuación en esta sección. Las perspectivas futuras y las preguntas inconclusas se desarrollarán hacia el final de este capítulo.

Objetivo específico 1: “Caracterizar las alteraciones en el crecimiento y funcionamiento de las raíces en plantas de *Arabidopsis thaliana* a partir de la aparición visible del tallo floral y en los estadios reproductivos de soja (*Glycine max*)”.

Este objetivo fue desarrollado en el capítulo III de la presente tesis. En un primer experimento se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo bajo un fotoperíodo inductivo de la floración (16hs) para acortar los tiempos del desarrollo. Primero, se procuró identificar estadios de desarrollo en base a caracteres vegetativos, pero debido a los tiempos de desarrollo prolongados y a la falta de caracteres morfológicos vinculados a cambios fisiológicos a corto plazo, se decidió determinar estadios de manera cualitativa a largo plazo. La

roseta se marchita tempranamente, mientras que las raíces y los tallos florales siguen acumulando biomasa por un tiempo más prolongado. En *Arabidopsis* la roseta representaría una etapa inicial del desarrollo vegetativo dando lugar luego a un periodo reproductivo caracterizado por la producción indeterminada de tallos florales, que también portan hojas. Esto podría indicar que en *Arabidopsis thaliana* hay cierta superposición entre el desarrollo vegetativo y reproductivo, o por lo menos no presenta los síntomas de senescencia de una planta monocárpica típica. Esto condujo a realizar ensayos en una especie monocárpica típica como la soja (*Glycine max*). Por otro lado, el decaimiento de la actividad respiratoria de las raíces posterior a la muerte de las hojas, indicaría que las raíces experimentan un envejecimiento por falta de fotoasimilados. Esto llevó a continuar el trabajo con *Arabidopsis thaliana* a un sistema experimental más adecuado y reproducible que consistió en la inducción de la senescencia en oscuridad.

A pesar de las diferencias en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y soja, se obtuvieron resultados similares en cuanto al metabolismo radical durante el desarrollo reproductivo. La respiración, el consumo de NO_3^- y la actividad NR relativas al pf de la raíz, en términos generales presentaron una tendencia a la disminución con el desarrollo de las plantas. Pero cuando el cálculo de actividad se realizó respecto del sistema radical completo, se observó una compensación de la actividad con la producción de biomasa. La actividad metabólica del sistema radical completo aumentó hacia los estadios intermedios y declinó hacia los estadios terminales del desarrollo, con la excepción de la actividad respiratoria, que se mantuvo por un tiempo más prolongado. En todos los parámetros medidos, tanto la actividad radical como

la de los tejidos aéreos siguieron el mismo patrón general de aumento en los estados iniciales, mantenimiento en los estado intermedios y disminución hacia el final del ciclo.

La semejanza en los patrones metabólicos radicales en *Arabidopsis thaliana* y soja, indicaría que la actividad radical no está ligada a un proceso de senescencia, al menos como el que ocurre en los tejidos fotosintéticos, sino más bien, al mantenimiento de esos tejidos aportando fotoasimilados. Pese a que tradicionalmente se daba por hecho que las raíces declinaban su actividad y su crecimiento tempranamente en el desarrollo reproductivo, los datos obtenidos en esta tesis indican que las raíces mantienen su actividad metabólica y acumulan biomasa aún durante el período de crecimiento de las semillas. Además, las raíces parecerían ser el destino más fuerte de fotoasimilados en ausencia de un destino fuerte como los frutos. La falta de compensación entre la cantidad de tejido producido y la actividad metabólica debidas al desfrutado serían indicadores de desajustes metabólicos y la AOX podría cumplir una función de “alivio” de las cantidades de poder reductor en las raíces. La cantidad de proteína total y mitocondrial hacia el final del llenado de granos podría indicar un aporte de N por la degradación de proteínas radicales y la redistribución del N resultante en el llenado de frutos en las etapas finales.

Con esto se considera que el objetivo específico 1 queda cumplido.

Objetivo específico 2: “*Caracterizar la actividad mitocondrial durante la senescencia en raíces*”.

Este objetivo fue desarrollado en el capítulo IV de esta tesis. Para esto, se estudiaron aspectos estructurales y metabólicos de las mitocondrias radicales durante la senescencia inducida por oscuridad. Se cuantificó el consumo de O₂, la cantidad de proteínas, la cantidad de azúcares solubles e insolubles (almidón) y se analizaron las mitocondrias por microscopía confocal. Con el fin de dilucidar la existencia de un efecto de hambreado de carbohidratos se realizaron ensayos suplementando las raíces en forma temporaria con una fuente carbonada (glucosa).

La actividad metabólica radical depende del aporte de fotoasimilados de los tejidos fotosintéticos. La repartición de biomasa entre las raíces y los tejidos fotosintéticos se modifica con la oscuridad prolongada. A esto se suma una caída en la actividad respiratoria, en la cantidad de proteína mitocondrial, y en el número total de mitocondrias (principalmente las de menor rango de tamaño). Debido a que las mitocondrias más pequeñas son las que cambian en mayor magnitud en los tratamientos de oscuridad, serían posiblemente las que más contribuyen a la actividad respiratoria radical. El hecho de que el número de mitocondrias activas descienda dramáticamente en la oscuridad prolongada pero no así las mitocondrias totales, parece indicar que existen conjuntos de mitocondrias con actividades basales o en “*standby*”. Por otro lado, los descensos de los contenidos de azúcares solubles podrían ser los responsables de las caídas de las tasas metabólicas ya que ejercerían un efecto de hambreado.

Con estos resultados se considera que el objetivo específico 2 queda cumplido.

Objetivo específico 3: *“Examinar los procesos probablemente involucrados en la degradación de mitocondrias durante la senescencia en raíces”.*

Este objetivo fue desarrollado en el capítulo IV de esta tesis. El estudio con un mutante de *Arabidopsis thaliana knock out* (atg5-KO) en la vía autofágica no arrojó resultados concluyentes. Los experimentos de senescencia inducida con estos mutantes arrojaron resultados confiables sólo en los tratamientos de hasta 5 días de oscuridad, donde se observó un comportamiento similar al de los controles. En los tratamientos de oscuridad más prolongada (10 días) las raíces que mostraron un avanzado estado de deterioro. En conclusión, puede rescatarse de estos experimentos que, en plantas donde la vía autofágica está bloqueada, las raíces parecen sufrir un deterioro importante antes que las hojas de la roseta y que estas mueren antes que los controles.

Con estos resultados, el objetivo específico 3 queda parcialmente cumplido.

Luego del cumplimiento de los dos primeros objetivos específicos y el cumplimiento parcial de tercero se concluye que el objetivo general (*“determinar las modificaciones funcionales y estructurales que sufren las mitocondrias durante la senescencia de hojas y raíces”*) queda cumplido. Con la evidencia obtenida de los ensayos realizados durante el transcurso de esta tesis se concluye que no es posible rechazar la hipótesis general de trabajo: *“las mitocondrias experimentan diversas modificaciones estructurales y funcionales que contribuyen a la función de hojas y raíces durante la*

senescencia de la planta, y que la degradación de mitocondrias en los órganos senescentes involucra una vía autofágica”.

Esta tesis aporta información sobre dos aspectos muy poco conocidos de la senescencia de las plantas anuales: las alteraciones que ocurren en las mitocondrias y en las raíces. El conocimiento de los cambios en las mitocondrias es fundamental para entender la senescencia de órganos en condiciones heterotróficas, v.g., la senescencia poscosecha de diversos órganos vegetales, y la senescencia de órganos heterotróficos como las raíces. Por otro lado, el conocimiento de las alteraciones que ocurren en las raíces durante la senescencia de las plantas asociada al desarrollo reproductivo es importante como marco de referencia para comprender diversos aspectos del balance de nutrientes durante el período de llenado de los granos en las plantas de cultivo. En tal sentido, esta tesis contribuye a llenar dos importantes vacíos en el conocimiento de la senescencia de las plantas.

5.2 Perspectivas futuras

De los resultados obtenidos en esta tesis surgen cuestiones por profundizar y preguntas por responder. Quedan por determinar aspectos del metabolismo mitocondrial de manera más específica y detallada. El aislamiento de mitocondrias de raíces, tanto de *Arabidopsis thaliana* como de soja, permitirán medir el consumo de oxígeno en presencia de diversos sustratos e inhibidores de distintos complejos mitocondriales (v.g. SHAM y CN⁻). Con esto se podrá determinar en qué proporción la respiración está asociada a vías alternativas (v.g. AOX) y en qué medida se modifican las vías de canalización de poder reductor en la cadena respiratoria completa. Esto también puede realizarse incubando segmentos de raíces. La determinación del control respiratorio (estado 3/estado 4) y relación ADP:O permitirá medir el grado de acoplamiento y la integridad de la membranas interna de las mitocondrias aisladas. Los contenidos de ATP y NADH indicarán el estado energético en que se encuentran las células. El seguimiento durante la senescencia de otras proteínas mitocondriales (además de COX2 y AOX) por medio de Western blots aportaría más información respecto la síntesis y degradación de proteínas. Hasta el momento fueron utilizados otros dos anticuerpos mitocondriales (NAD9 y ALLCAs) cuya detección no se pudo poner a punto. La cuantificación de mitocondrias de otros tejidos (v.g. floema) permitirá completar la información obtenida y realizar cálculos de una posible exportación de mitocondrias a través de los tejidos de conducción (se ha podido observar en ciertas ocasiones en el microscopio confocal movimiento de mitocondrias que corresponderían al cilindro vascular de la raíz.). Con esto se complementaría la

información ya obtenida referente a la dinámica mitocondrial en relación a la senescencia.

El seguimiento de la muerte celular radical aportaría información respecto de otro aspecto de la senescencia. También permitiría realizar correcciones respecto de la actividad metabólica radical global. Los métodos de seguimientos de muerte celular en raíces son variados (v.g. medición de la turgencia celular con una microsonda, tinciones con Evans blue, tinciones con yoduro de propidio y fluoresceína, tinciones con trifeniltetrasolium, tinciones con rojo neutro) y fueron probados tanto en soja como en *Arabidopsis thaliana* pero sin resultados que fueran reproducibles. La puesta a punto de este tipo de técnicas será un paso a seguir.

De manera general, la determinación de N y C en los tejidos puede aportar información respecto de la relocalización de recursos. La cuantificación de almidón y de azúcares solubles en las raíces de soja también permitirá determinar si los sistemas de senescencia inducida por oscuridad y la senescencia monocárpica son similares en relación a la hipótesis de hambreado de fotoasimilados en las raíces.

Queda por estudiar de manera más profunda el papel de la autofagia en la degradación de componentes de las mitocondrias radicales. El seguimiento más detallado y en un menor plazo de las raíces de las plantas atg5-KO es una alternativa para abordar este tema. La obtención de plantas atg5-KO que expresen mt-YFP será un avance para estudiar la dinámica mitocondrial en ausencia de la vía autofágica (hasta el momento la obtención de cruces entre plantas que expresan mt-YFP y atg5-KO resultó en una descendencia que expresa mt-YFP en escaso número de células y por lo tanto se descartó su

utilización en los ensayos). La utilización de líneas que expresen proteínas fluorescentes tanto en mitocondrias como en autofagosomas posiblemente también permita avanzar en esta área. Por otro lado, el estudio de proteínas y expresión de genes vinculados a la autofagia en raíces durante el transcurso de la senescencia en raíces, quizás sea un enfoque plausible. De todas maneras, los datos obtenidos en esta tesis sirven de punto de partida para enfocar de manera más precisa los futuros estudios.

Una de las cuestiones que surgen observando los resultados obtenidos en soja es el posible impacto del gasto metabólico y la acumulación de biomasa en las raíces como destino de fotoasimilados durante el período de llenado de granos, en el rendimiento de los cultivos. Esto podría generar un compromiso entre la generación de un sistema radical extendido para capturar recursos edáficos vs. un sistema radical más reducido que consuma menos fotoasimilados. La determinación del costo de recursos en la raíces y en qué grado compiten por los fotoasimilados con los frutos en condiciones no limitantes podría evaluarse en un sistema hidropónico como el utilizado en esta tesis y sometiendo a las plantas a una remoción de parcial de raíces y frutos. Por otro lado, la determinación del impacto de la inversión de fotoasimilados en las raíces de distintas variedades en función del suministro de recursos edáficos en un sistema más realista (cultivo a campo) podrá aportar información concreta de potencial uso en los programas de mejora. Argentina ocupa el tercer lugar de producción mundial de soja con 57 millones de toneladas detrás de Estados Unidos y Brasil, casi el 17% del área mundial sembrada con soja y representa el 18% de la producción mundial (USDA Circular Series WAP 6-15). En los últimos años, se ha registrado un aumento

de la producción de granos debido a una fuerte expansión del área sembrada, pero para aumentar los niveles de producción preservando los ambientes hay que utilizar variedades mejoradas con altos rendimientos. De esta manera, no habría la necesidad de expandir la frontera agrícola para obtener mayores producciones. Esto es una muestra de la potencial utilidad que puede presentar la información obtenida en esta tesis y los futuros estudios derivados de ella.

Bibliografía

APHA, AWWA and WPCF (1985) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edition. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, New York

Armstrong, A. F., Logan, D. C., Tobin, A. K., O'Toole, P., y Atkin, O. K. (2006). Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant, Cell and Environment, 29(5), 940–949.

Arpagaus, S., Rawyler, A., y Braendle, R. (2002). Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. The Journal of Biological Chemistry, 277(3), 1780–1787.

Atkin, O. K., Millar, A. H., Gardeström, P., y Day, D. A. (2000). Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. En: Photosynthesis (pp. 153-175). Springer Netherlands.

Attallah, C. V, Welchen, E., Martin, A. P., Spinelli, S. V, Bonnard, G., Palatnik, J. F., y Gonzalez, D. H. (2011). Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. Journal of Experimental Botany, 62(12)

- Barberis Noelia A. y Bongiovanni Rodolfo “Resultado económico esperado de la agricultura, campaña agrícola 2015/2016. Informe económico para el productor II: Departamento Río Segundo, Córdoba, incorporando balance de nutrientes. (Mayo 2015)”. Cartilla Digital Manfredi ISSN On line 1851-7994
- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Guamet, J. J., Montaldi, E., y Puntarulo, S. (1995). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals. *Plant Science*, 104(2), 161-168.
- Bartoli, C. G., Pastori, G. M., y Foyer, C. H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology*, 123(1), 335-344.
- Bartoli, C. G., Gomez, F., Gergoff, G., Guamét, J. J., y Puntarulo, S. (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(415), 1269-1276.
- Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., y Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in Development and Stress Responses of Plants. *Autophagy*, 2(1), 2–11.
- Benda, C. (1898). Weitere mitteilungen über die mitochondria. *Verh Dtsch Physiol Ges*, 376-383.
- Bingham, I. J., y Rees, R. M. (2008). Senescence and N release from clover roots following permanent excision of the shoot. *Plant and Soil*, 303(1-2), 229–240.

- Bloom, a J., Sukrapanna, S. S., y Warner, R. L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*, 99(4), 1294–1301.
- Bolte, S., y Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), 13–232.
- Borrás, L., Slafer, G. a., y Otegui, M. E. (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: A quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, 86(2-3), 131–146.
- Brouquisse, R., Gaudillère, J.P., y Raymond, P. (1998). Induction of a Carbon-Starvation-Related Proteolysis in Whole Maize Plants Submitted to Light/Dark Cycles and to Extended Darkness. *Plant Physiology*, 117(4), 1281–1291.
- Brouquisse, R., James, F., Raymond, P., y Pradet, A. (1991). Study of glucose starvation in excised maize root tips. *Plant Physiology*, 96(2), 619–626.
- Brouquisse, R., Rolin, D., Cortés, S., Gaudillère, M., Evrard, A., y Roby, C. (2007). A metabolic study of the regulation of proteolysis by sugars in maize root tips: Effects of glycerol and dihydroxyacetone. *Planta*, 225(3), 693–709.
- Comas, L. H., Eissenstat, D. M., y Lakso, A. N. (2000). Assessing root death and root system dynamics in a study of grape canopy pruning. *New Phytologist*, 147(1), 171–178.

- Costa M.L., Civello P.M., Chaves A.R. y Martínez G.A. (2005) Effect of hot air treatments on senescence and quality parameters of harvested broccoli (*Brassica oleracea* L var *Italica*) heads. Journal of the Science of Food and Agriculture Volume 85, Issue 7, pages 1154–1160.
- Considine, M. J., Holtzapffel, R. C., Day, D. A, Whelan, J., y Millar, A. H. (2002). Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. Plant Physiology, 129(3), 949–953.
- Couée, I., Jan, M., Carde, J. P., Brouquisse, R., Raymond, P., y Pradet, a. (1992). Effects of glucose starvation on mitochondrial subpopulations in the meristematic and submeristematic regions of maize root. Plant Physiology, 100(4), 1891–1900.
- Crafts-Brandner, S. J., Below, F. E., Harper, J. E., y Hageman, R. H. (1984). Effects of Pod Removal on Metabolism and Senescence of Nodulating and Nonnodulating Soybean Isolines: II. Enzymes and Chlorophyll. Plant Physiology, 75(2), 318–322.
- Crawford, N. M., y Glass, A. D. . (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science, 3(10), 389–395.
- Curtis, M. J., y Wolpert, T. J. (2002). The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. Plant Journal, 29(3), 295–312.

- Day, D. a., Millar, a. H., Wiskich, J. T., y Whelan, J. (1994). Regulation of Alternative Oxidase Activity by Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Plant Physiology*, 106(4), 1421–1427.
- Deane-Drummond, C. E., y Clarkson, D. T. (1979). Effect of Shoot Removal and Malate on the Activity of Nitrate Reductase Assayed in Vivo in Barley Roots (*Hordeum vulgare* cv. Midas). *Plant Physiology*, 64(4), 660–662.
- Diamond, M., y McCabe, P. F. (2007). The mitochondrion and plant programmed cell death. En: *Plant Mitochondria*. Logan D.C. (Eds) Blackwell Publishing, pp. 308-334.
- Diaz, C., Lemaître, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., ... Masclaux-Daubresse, C. (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 147(3), 1437–1449.
- Elthon, T. E., y McIntosh, L. (1986). Characterization and Solubilization of the Alternative Oxidase of *Sauromatum guttatum* Mitochondria. *Plant Physiology*, 82(1), 1–6.
- Escobar, M., Geisler, D., y Rasmusson, A.G. (2006). Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 45(5), 775–788.

- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., y Pennington, J. S. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop science, 11(6), 929-931.
- Fisher, M. C. T., Eissenstat, D. M., y Lynch, J. P. (2002). Lack of evidence for programmed root senescence in common bean (*Phaseolus vulgaris*) grown at different levels of phosphorus supply. New Phytologist 153: 63–71
- Finnegan, P. M., Whelan, J., Millar, a H., Zhang, Q., Smith, M. K., Wiskich, J. T., y Day, D. a. (1997). Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. Plant Physiology, 114(2), 455–466.
- Finnegan, P. M., Soole, K. L., y Umbach, A. L. (2004). Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. En: Plant Mitochondria: From Genome to Function. David A. Day, D.A., Millar H.A., Whelan J. (Eds.) . Springer Netherlands. pp. 163-230
- Font Quer P. (1970). Diccionario de Botánica. Labor S.A.
- Gan S. (2007) Senescence Process in Plants. Blackwell Publishing
- Giege, P. (2005). Coordination of Nuclear and Mitochondrial Genome Expression during Mitochondrial Biogenesis in Arabidopsis. The Plant Cell, Vol. 17, 1497–1512.
- Goldberg, R. B. (1988). Plants: novel developmental processes. Science (New York, N.Y.), 240(4858), 1460–1467.

- Gordon, W. S., y Jackson, R. B. (2000). Nutrient concentrations in fine roots. *Ecology*, 81(1), 275-280.
- Griffin, K. L., Anderson, O. R., Gastrich, M. D., Lewis, J. D., Lin, G., Schuster, W., Seemann J.R., Tissue D.T. ,Turnbull M.H., y Whitehead, D. (2001). Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2473–2478.
- Hall, A. J., Connor, D. J., y Whitfield, D. M. (1990). Root respiration during grain filling in sunflower: the effects of water stress. *Plant and Soil*, 121(1), 57-66.
- Harper J.E. (1971). Seasonal Nutrient Uptake and Accumulation Patterns in Soybeans. *Crop Science* Vol. 11 no. 3, 347-350
- Harris, B. Y. D., Pacovsky, R. S., y Paul, E. a. (1985). Carbon economy of soybean–*Rhizobium glomus* associations. *New Phytologist*, 101(3), 427–440.
- Haughn, G. W., Schultz, E. a, Martinezzapater, J. M., y Martinez-Zapater, J. M. (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis, and mutants. *Can.J.Bot.*, 73(7), 959–981.
- Herold A.(1980) Regulation of Photosynthesis by sink activity - The missing link. *New Phytol.* 86, 131-144

- Hiser, C., y McIntosh, L. (1990). Alternative Oxidase of Potato Is an Integral Membrane Protein Synthesized de Novo during Aging of Tuber Slices. *Plant Physiology*, 93(1), 312–318.
- Hurry, V., Igamberdiev, A., Keerberg, O., Pärnik, T., Atkin, O., Zaragoza-Castells, J., y Gardeström, P. (2005). Respiration in Photosynthetic Cells: Gas Exchange Components, Interactions with Photorespiration and the Operation of Mitochondria in the Light. *Plant Respiration*, 18, 43–61.
- Ishibashi, H., Konno, K., Kawachi, T., Harada, H., Sato, T., Ohtake, N., ... Sueyoshi, K. (2008). Isolation and characterization of a novel *Arabidopsis thaliana* mutant that shows low nitrate concentration in shoots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 103–107.
- Jones M.L. (2004) Change in Gene Expression during Senescence. En: *Plant Cell Death Processes*. Noodén L.D. (Eds). Elsevier Academic Press. pp. 51-73
- Journet, E. P., Bligny, R., y Douce, R. (1986). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(7), 3193–3199.
- Juszczuk, I. M., y Rychter, A. M. (2003). Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1257–1271.
- Keech, O., Pesquet, E., Ahad, A., Askne, A., Nordvall, D., Vodnala, S. M., Touminen H., Hurry V., Dizengremel P. y Gardeström, P. (2007). The different

fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30(12), 1523–1534.

Kennedy E.P. y Lehninger A.L. (1949) Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 179:957-972.

Kerr, P. S., Rufty, T. W., y Huber, S. C. (1985). Changes in Nonstructural Carbohydrates in Different Parts of Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) Plants during a Light/Dark Cycle and in Extended Darkness. *Plant Physiology*, 78(3), 576–581.

Köhler, R.H., Zipfel, W.R., Webb, W.W. y Hanson, M.R. (1997) The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *Plant J.* 11, 613–621.

Laemmli U.K.. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-5.

Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienemberger, J. M., Bonnard, G., y Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 14144-14149.

Lambers, H., Atkin, O., y Scheurwater, I. (2000). Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. En: *Plant Roots. The Hidden Half*. Y. Waisel, A. Eshel, and K. Kafkaki, Eds. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Leggett, J. E. y Frere M. H, (1971). Growth and nutrient uptake by soybean plants in nutrient solutions of graded concentrations. *Plant Physiology*, 48(4), 457–460.
- Leopold, A. C., Niedergang-Kamien, E., y Janick, J. (1959). Experimental Modification of Plant Senescence. *Plant Physiology*, 34(5), 570.
- Lewis, M. R., & Lewis, W. H. (1914). Mitochondria in tissue culture. *Science*, 330-333.
- Logan, D. C., y Leaver, C. J. (2000). Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 51(346), 865–871.
- Logan, D. C. (2003). Mitochondrial dynamics. *New Phytologist*, 160(3), 463–478.
- Logan, D. C. (2008). Having a swell time – mitochondrial morphology and plant cell death programmes. *Journal of Microscopy*, Vol. 231, pp. 215–224
- López-Juez, E., y Devlin, P. F. (2008). Light and the control of plant growth. In: *Plant Growth Signaling* (pp. 223-242). Springer Berlin Heidelberg.
- Mach, J. M., Castillo, R., Hoogstraten, R., y Greenberg, J. T. (2001). The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene ACD2 encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 771–776.

- Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., y Kroemer, G. (1996). Chloromethyl - X - Rosamine is an aldehyde - fixable potential - sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry*, 25(4), 333-340.
- Mackenzie, S., y McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *The Plant Cell*, 11(4), 571-585.
- Malik N.S.A (1983). Grafting experiments on the nature of the decline N_2 fixation during fruit development in soybean. *Physiol. Plant.* 57: 561-564
- Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., Van Driel, R., y Aten, J. A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *Journal of cell science*, 103(3), 857-862.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., y Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105(7), 1141–1157.
- Millar, a H., Finnegan, P. M., Whelan, J., Drevon, J. J., y Day, D. a. (1997). Expression and kinetics of the mitochondrial alternative oxidase in nitrogen-fixing nodules of soybean roots. *Plant Cell and Environment*, 20(10), 1273–1282.

- Millard, P., y Grelet, G. A. (2010). Nitrogen storage and remobilization by trees: Ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology*, 30(9), 1083–1095.
- Møller I.M. (2007) Mitochondrial electron transport and oxidative stress. En: *Plant Mitochondria*. Logan D.C. (Eds) Blackwell Publishing, pp. 185-212
- Mondal M.H., Brun W.A. y Brenner M.L. (1978) Effects of Sink Removal on Photosynthesis and Senescence in Leaves of Soybean (*Glycine max* L.) Plants. *Plant Physiol.* 61, 394-397
- Nelson, B. K., Cai, X., y Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal*, 51(6), 1126–1136.
- Nemhauser, J., y Chory, J. (2002). Photomorphogenesis. The *Arabidopsis* book. American Society of Plant Biologists.
- Neumann, G., George, T. S., y Plassard, C. (2009). Strategies and methods for studying the rhizosphere-the plant science toolbox. *Plant and Soil*, 321(1-2), 431–456.
- Nobuyasu, H., Liu, S., Mohapatra, P. K., y Fujita, K. (2003). Variation in the export of ^{13}C and ^{15}N from soybean leaf : the effects of nitrogen application and sink removal. *Plant and Soil*, (1980), 331–339.

Nooden, L. D. (1984). Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. *Physiologia Plantarum*, 62(2), 273–284.

Noodén LD y Leopold AC (1988) Senescence and Aging in Plants. Academic Press

Noodén LD (1988a). The Phenomena of Senescence and Aging. En: Senescence and Aging in Plants. Noodén LD, Leopold AC, (Eds), Academic Press, pp. 2-38.

Noodén LD (1988b). Whole Plant Senescence. En: Senescence and Aging in Plants. Noodén LD, Leopold AC, (Eds), Academic Press, pp. 391-440.

Noodén, L. D., y Guiamét, J. J. (1989). Minireview Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants. *Physiologia Plantarum*, 77, 267–274.

Noodén, L. D., Singh, S., y Letham, D. S. (1990). Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiology*, 93(1), 33–39.

Nooden, L. D., y Letham, D. S. (1993). Cytokinin Metabolism and Signalling in the Soybean Plant. *Functional Plant Biology*, 20(5), 639-653.

Noodén, L. D., y Penney, J. P. (2001). Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2151–2159.

- Noodén L.D. (2004) Plant Cell Death Processes. Noodén L.D. (Eds). Elsevier Academic Press.
- Norén, H., Svensson, P., y Andersson, B. (2004). A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 343–348.
- Nunes-Nesi, A., y Fernie, A. R. (2007). Mitochondrial metabolism. En: Plant Mitochondria. Logan D.C. (Eds) Blackwell Publishing, pp 212-277.
- Palade, G. E. (1952). The fine structure of mitochondria. *The Anatomical Record*, 114(3), 427-451.
- Peoples, M. B., Pate, J. S., y Atkins, C. A. (1983). Mobilization of nitrogen in fruiting plants of a cultivar of cowpea. *Journal of Experimental Botany*, 34(5), 563-578.
- Peoples M.B. y Dalling M.J. (1988) The interplay between Proteolysis and Amino Acid Metabolism during Senescence and Nitrogen Reallocation. En: *Senescence and Aging in Plants*. Noodén LD, Leopold AC, (Eds), Academic Press, pp. 182-219.
- Perales, M., Parisi, G., Fornasari, M. S., Colaneri, A., Villarreal, F., González-Schain, N., ... y Zabaleta, E. (2004). Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I. *Plant molecular biology*, 56(6), 947-957.

- Pogson, B. J., y Morris, S. C. (2004). Postharvest Senescence of Vegetables and its Regulation. En: Plant Cell Death Processes. Noodén L.D. (Eds). Elsevier Academic Press., 319–329.
- Quijano, A., y Morandi, E. N. (2011). Post-flowering leaflet removals increase pod initiation in soybean canopies. *Field Crops Research*, 120(1), 151–160.
- Ribas-Carbo, M., Lennon, a. M., Robinson, S. a., Giles, L., Berry, J. a., y Siedow, J. N. (1997). The Regulation of Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Soybean Cotyledon and Root Mitochondria. *Plant Physiology*, 113(3), 903–911.
- Roby, C., Martin, J-B., Bligny, R., y Douce, R. (1987). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(11), 5000–5007.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., y Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 675-709.
- Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Forry, K. R., Durall, D. M., y Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(1), 2–11.

- Salisbury, F. J., Hall, A., Grierson, C. S., y Halliday, K. J. (2007). Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant Journal*, 50(3), 429–438.
- Scott I. y Logan D.C. (2007). Mitochondrial dynamics: the control of mitochondrial shape, size, number, motility, and cellular inheritance. En: *Plant Mitochondria*. Logan D.C. (Eds) Blackwell Publishing, pp. 1-36
- Sengupta, A., y Banerjee, H. (2012). Soil-less culture in modern agriculture. *World J. Sci. Technol*, 2(7), 103-108.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., ... y Goff, S. A. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell*, 14(12), 2985-2994.
- Sheehy J.E., Mnzava M., Cassman K.G., Mitchell P.L., Pablico P., Robles R.P., Samonte H.P., Lales J.S. y Ferrer A.B. (2004). Temporal origin of nitrogen in the grain of irrigated rice in the dry season: the outcome of uptake, cycling, senescence and competition studied using a ^{15}N -point placement technique. *Field Crops Research* Volume 89, Issues 2–3, Pages 337–348
- Smirnoff, N., y Stewart, G. R. (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. *Physiologia Plantarum*, 64(2), 133–140.

- Steuer, R., Nesi, A. N., Fernie, A. R., Gross, T., Blasius, B., y Selbig, J. (2007). From structure to dynamics of metabolic pathways: application to the plant mitochondrial TCA cycle. *Bioinformatics*, 23(11), 1378-1385.
- Thomas, H., Thomas, H. M., y Ougham, H. (2000). Annuality, perenniality and cell death. *Journal of Experimental Botany*, 51(352), 1781–1788.
- Thomas, H., y Ougham, H. (2014). The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 3889–3900.
- Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., y Vierstra, R. D. (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiology*, 138(4), 2097–2110.
- Thompson, A. R., y Vierstra, R. D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 165-173.
- Vanlerberghe, G. C., Robson, C. A, y Yip, J. Y. H. (2002). Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiology*, 129(4), 1829–1842.
- Warburg O. (1913). *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* , Volume 154, Issue 9-10, pp 599-617

- Whitelam, G. C., y Devlin, P. F. (1997). Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant, Cell y Environment*, 20(6), 752-758.
- Wittenbach V.A (1982) Effect of Pod Removal on Leaf Senescence in Soybeans. *Plant Physiol.* (1982) 70, 1544-1548
- Woo H.R., Lim P.O., Nam H.G., Noodén L.D. (2004) Genes that Alter Senescence. En: *Plant Cell Death Processes*. Noodén L.D. (Eds). Elsevier Academic Press.
- Yemm, E. W., y Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., y Ohsumi, Y. (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *The Plant Cell*, 16(11), 2967–2983.
- Yoshinaga, K., Arimura, S. I., Niwa, Y., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., y Kawai-Yamada, M. (2005). Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 96(2), 337–342.
- Yoshinaga, K., Fujimoto, M., Arimura, S. I., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., y Kawai-Yamada, M. (2006). The mitochondrial fission regulator DRP3B does not regulate cell death in plants. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution*, 97(6), 1145–1149.

Zottini, M., Barizza, E., Bastianelli, F., Carimi, F., y Lo Schiavo, F. (2006). Growth and senescence of *Medicago truncatula* cultured cells are associated with characteristic mitochondrial morphology. *New Phytologist*, 172(2), 239–247.